

# Regulation der Zellteilung bei Escherichia coli. Funktionelle Analyse einzelner Teilungsschritte.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie (23)

der Freien Universität Berlin

---

vorgelegt von

Adam Onken

aus Dresden

1972

---



# Regulation der Zellteilung bei *Escherichia coli*. Funktionelle Analyse einzelner Teilungsschritte.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie (23)

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Adam Onken**

aus Dresden

1. Referent: Professor Dr. T. Trautner

2. Referent: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 1972



## INHALT

|                                                                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Zusammenfassung                                                                                                 | S. 1 |
| Einleitung                                                                                                      | S. 3 |
| Material und Methoden                                                                                           | S. 7 |
| Ergebnisse                                                                                                      | S.13 |
| Bestimmung des Endes einer Replikationsrunde                                                                    | S.14 |
| Empfindlichkeit von Bakterienzellen auf Penicillin                                                              | S.16 |
| Pulse von Penicillin mit synchronen Bakterienzellen                                                             | S.17 |
| Abhängigkeit der Penicillinempfindlichkeit vom Replikationsende                                                 | S.20 |
| Inaktivierung von E. coli B/r nach Infektion mit dem Bakteriophagen T4                                          | S.22 |
| Die Phagenaufnahme variiert nicht während des Teilungszyklus                                                    | S.27 |
| Der Wechsel von einer 1-Treffer- zu einer 2-Treffer-Kinetik nach T4 Infektion ist abhängig vom Replikationsende | S.29 |
| Abhängigkeit der "T4-Tötungsschranke" vom penicillin-sensitiven Teilungsschritt                                 | S.31 |
| Inaktivierung synchroner Bakterienzellen durch Colicin E2                                                       | S.33 |
| E2-Toleranz beruht nicht auf einer gestörten Aufnahme des Bakteriocids                                          | S.37 |
| Hemmung der DNA Synthese verhindert die E2-Toleranz                                                             | S.37 |
| Colicin-Toleranz tritt auch nach Hemmung der Teilung durch Penicillin auf                                       | S.39 |
| Physiologische und physische Teilung von E. coli B/r/1                                                          | S.41 |

|                                                   |      |
|---------------------------------------------------|------|
| Rekombination von T4 in E. coli B/r/1             | S.42 |
| Komplementation von T4 in E. coli B/r/1           | S.46 |
| Teilungsstadien im elektronenmikroskopischen Bild | S.48 |
| Diskussion                                        | S.52 |
| Literatur                                         | S.62 |
| Danksagung                                        | I    |
| Lebenslauf                                        | II   |

## ZUSAMMENFASSUNG

Unter Verwendung von Penicillin, dem Bakteriophagen T4 und dem Colicin E2 gelang es, die Teilungsphase von synchron wachsenden *E. coli* B/r in einzelne Teilungsschritte zu unterteilen.

Bei einer Generationszeit von 45 min wurde bei einem Zellalter von 30 min eine erhöhte Syntheserate der Zellwand beobachtet, gemessen als erhöhte Empfindlichkeit der Bakterien gegen die Einwirkung von Penicillin. Sie führt in der Zentralregion schließlich zur Bildung neuer Polkappen.

Weitere 5 min später, bei einem Zellalter von 35 min ergab sich nach Infektion mit dem Phagen T4 eine Unterteilung des Bakteriums in zwei Tötungseinheiten. Dadurch erfolgte ein Wechsel der Inaktivierung von einer 1-Treffer zu einer 2-Treffer Kinetik und ein plötzlicher Anstieg an überlebenden Zellen. Die Höhe des Anstiegs war abhängig von der Multiplizität der Infektion.

Nach der Behandlung von Bakterienkulturen mit dem Colicin E2 wurde ein Zellalter beobachtet, bei dem die Bakterien weniger empfindlich waren gegen den E2-Tötungseffekt. Dieser Schritt lag zeitlich zwischen dem penicillin-sensitiven Teilungsschritt und dem Schritt, der durch einen Wechsel der Trefferkinetik nach T4 Infektion gekennzeichnet war. Es konnte bei der E2-Toleranz keine Abhängigkeit von der Multiplizität beobachtet werden.

Jeder einzelne Teilungsschritt zeigte eine direkte Abhängigkeit von der vorherigen erfolgreichen Beendigung einer DNA Replikationsrunde. Darüber hinaus konnte auch eine Abhängigkeit untereinander festgestellt werden, die eine Zuordnung der Teilungsschritte zu unterschiedlichen Stoffwechselwegen ("pathways") verlangte.

Das vorgeschlagene Konzept einer physiologischen Teilung, das davon ausgeht, daß die Zelle vor der eigentlichen Trennung der Tochterzellen bereits durch ein Membranseptum in zwei unabhängige Kompartimente aufgeteilt wird, konnte nicht bestätigt werden. Durch genetische Tests, wie auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde gezeigt, daß innerhalb der Zellen bis kurz vor der Teilung der Austausch von DNA und Proteinmolekülen möglich war, und die Plasmabereiche in unmittelbarem Kontakt blieben.

## Einleitung

In einer Bakterienzelle ist die Chromosomenreplikation so reguliert, daß sich der Gehalt an DNA in der gleichen Zeit verdoppelt, in der sich auch die Plasmamenge verdoppelt. Darüberhinaus muß vor der Trennung der Tochterzellen das genetische Material aufgeteilt sein. Das heißt, daß es eine enge Koordinierung zwischen dem DNA Replikationszyklus und dem Teilungszyklus geben muß.

Zwei Möglichkeiten sind für die Verknüpfung beider Prozesse denkbar: die Zellteilung gibt das Signal für den Beginn einer DNA Replikationsrunde, oder die Beendigung einer Replikationsrunde gibt das Signal für die Zellteilung.

Für die Koordinierung des Teilungszyklus bei E. coli wurde von Maaløe (Maaløe, 1961; Maaløe und Kjelgaard, 1966) ein Modell aufgestellt, das später weitgehend experimentell bestätigt wurde.

Danach ist die Rate der DNA Synthese pro Wachstumspunkt konstant, und somit auch die Zeit, die ein Wachstumspunkt benötigt, um die Länge eines Chromosoms zu durchlaufen. Sie beträgt bei E. coli B/r 40 min bei Verdoppelungszeiten von weniger als 1 Stunde (Clark und Maaløe, 1967; Helmstetter, 1967). Die DNA Syntheserate pro Zelle wird an die gesamte Wachstumsrate angepaßt durch Regulation der Häufigkeit der Initiation (Bird und Lark, 1968; Caro und Berg, 1969).

Für die jeweiligen Wachstumsbedingungen erfolgt sie in konstanten Intervallen (Helmstetter und Cooper, 1968; Cooper und Helmstetter, 1968; Helmstetter et al., 1968).

Die Zeit zwischen dem Ende einer Replikationsrunde und der anschließenden Zellteilung ist ebenfalls konstant und unabhängig von der Generationszeit, wiederum bei Generationszeiten von weniger als 60 min. Bei E. coli B/r beträgt sie 20 min (Helmstetter, 1969; Pierucci, 1972). In dieser Periode geht bei schnell wachsenden Bakterien die DNA Synthese weiter, sie ist aber für den eigentlichen Teilungsablauf nicht nötig. Dagegen ist die Beendigung der vorhergehenden Replikationsrunde notwendige Voraussetzung für die Teilung (Clark und Maaløe, 1967; Clark, 1968; Helmstetter und Pierucci, 1968; Cooper und Helmstetter, 1968). Bei Hemmung der DNA Synthese durch UV, Mitomycin C oder Nalidixin Säure können sich Zellen, die das Ende der Replikationsrunde erreicht haben, noch teilen, d.h. daß die Zellzahl noch für etwa 20 min zunimmt (Pierucci, 1969; Pierucci und Helmstetter, 1969).

Die Signalwirkung des Replikationsendes für die anschließende Teilungsphase wird durch das Teilungsverhalten bestimmter temperatur-sensitiver (ts) DNA-Mutanten (ref. in Gross, 1971) bestätigt, die nach Erhöhung der Temperatur entweder sofort mit der DNA Synthese aufhören (Elongationsmutanten dnaB, D, E, F, G), oder nach einer charakteristischen Restsynthese (Initiationsmutanten dnaA, C).

Als Teilungsphase sollen in dieser Arbeit die Vorgänge verstanden werden, die während der 20 min zwischen dem Signal durch das Replikationsende und der anschließenden physischen Trennung der Tochterzellen ablaufen. Diese Prozesse können auf verschiedene Weise untersucht werden:

- a) durch das Verhalten bestimmter Teilungsmutanten, die in den meisten Fällen konditional letal (ts) sind (Hirota et al., 1968),
- b) durch die Blockierung einzelner Teilungsschritte mit Hilfe spezifischer Inhibitoren,
- c) durch elektronenmikroskopische Analyse (Rogers, 1970; Ryter, 1968; Steed und Murray, 1966).

Bisher wurde die Teilungsphase hauptsächlich an Teilungsmutanten untersucht (Kohiyama et al., 1966; Adler et al., 1967; Reeve et al., 1970; Inouye, 1969), die sich aufgrund ihres Verhaltens in 3 Hauptklassen einteilen lassen.

Klasse A zeigt einen normalen Teilungszyklus. Zusätzlich werden aber spontan kleine Zellen ("minicells") abgeteilt, die keine DNA enthalten.

Klasse B kann sich nicht mehr teilen und bildet Filamente. In diesen werden die Chromosomen entweder noch normal segregiert oder nicht mehr segregiert, so daß sich bei fortgesetzter Replikation DNA-Stränge in der Zellmitte anhäufen. Beide Eigenschaften können zusätzlich mit anormaler Zellteilung und der Produktion kernloser Zellen gekoppelt sein, die etwa die Größe von frischgeteilten Zellen haben.

Klasse C verbindet die Merkmale einer dnaB Mutante mit der Fähigkeit zur Teilung. Auch dadurch entstehen Zellen, die kein Chromosom haben.

In einigen dieser Teilungsmutanten konnten bei nicht-permissiver Temperatur veränderte Membranproteine nachgewiesen werden (Inouye und Guthrie, 1969; Inouye und Pardee, 1970; Siccardi et al., 1971).

Es ist nicht möglich, die Teilungsmutanten aufgrund ihres Verhaltens in eine Ordnung zu bringen, die auf einen linearen, sequentiellen Ablauf aller Teilungsprozesse schließen ließe. Vielmehr muß eine komplexe Verknüpfung der Teilungsschritte angenommen werden, da unter Bedingungen, bei denen ein oder mehrere Funktionen blockiert sind, andere noch weitgehend normal ausgeführt werden.

Diese Arbeit unternimmt es, einzelne Teilungsschritte, neben der elektronenmikroskopischen Analyse, durch Inhibitoren zu charakterisieren. Diese Inhibitoren, Penicillin, der Bakteriophage T4 und Colicin E2, reagieren in weitgehend bekannter Weise mit bestimmten Komponenten der Zellhülle. Die Koordinierung der Teilungsschritte wird untersucht. Es ergibt sich auch bei dieser Analyse, daß sie nicht einer einzigen Sequenz zugeordnet werden können, sondern daß Teilungsprozesse auf parallelen Wegen ablaufen.

## MATERIAL UND METHODEN

### Bakterienstämme

E. coli B/r/l ist ein Tl-resistenter Abkömmling von E. coli B/r, ATC C No 12407. Der Stamm ist besonders gut geeignet für Synchronisation, da sich die Zellen nach der Teilung sofort trennen und keine Ketten bilden. E. coli B/r-301 ( $F^-$ ,  $leu^-$ ,  $pro^-$ ,  $his^-$ ,  $try^-$ ,  $arg^-$ ,  $thy^-$ ,  $met^-$ ,  $Sm^R$ ,  $dra^-$  oder  $drm^-$ ,  $hsp^{K12}$ )<sup>+</sup> stammt ab von HB50 von H. Boyer. Er trägt die Modifikations- und Restriktionsregion des K12-Stammes.

E. coli B/r-301 dnaB ist temperatursensitiv in Bezug auf DNA Synthese und entstand aus einer Kreuzung von E. coli B/r-301 mit Hfr13 Ts dnaB. Hfr13 Ts-dnaB wurde von F. Bonhoeffer aus dem Stamm W 1485-Hfr gewonnen.

E. coli CA 42 wurde uns von P. Frédérpç überlassen. Es ist ein colicinogener Stamm, dessen Episom nach Induktion Colicin E2 produziert.

CR 63 ist ein E. coli K12 Stamm mit amber-Suppressor.

### Bakteriophagen

T4 amber 17 trägt eine Mutation in Gen 23, das für ein Kopfprotein kodiert.

T4 am 128 liegt in Gen 11 und ist defekt in einem Schwanzprotein.

T4 am N82 ist eine Gen 44-Mutante, die keine nachweisbare DNA-Synthese hat (Warner u. Hobbs, 1967), ebenso T4 am N122 (Gen 42), bei der keine Induktion von dCMP-hydroxymethylase stattfindet.

+ Abkürzungen für genetische Eigenschaften siehe Taylor (1970)

### Medien und Lösungen

Minimalmedium (008) enthält folgende Salze per 1 Liter demineralisierten Wassers: 2 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g  $\text{NaCl}$ , 0.175 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und als Kohlenstoffquelle 2 g Glucose.

Wenn nötig wurde das Medium durch Aminosäuren angereichert (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Als Vollmedium wird ein Trypton Yeast-Extrakt (Difco) benutzt (TY), das 0.5 %  $\text{NaCl}$  enthält.

### Wachstumsbedingungen

Alle Stämme wurden auf TY-Platten bei  $4^\circ$  aufbewahrt. Übernachtskulturen wurden in flüssigem TY-Medium angesetzt. Zur Vorbereitung einer Synchronisation wurden Übernachtskulturen in 008 angesetzt und daraus 0.01 ml in 100 - 150 ml synthetisches Medium überimpft und im Wasserbad (New Brunswick) inkubiert.

Die Generationszeit von E. coli B/r beträgt in Glucose-Minimalmedium 40 - 45 Minuten. Während dieser Zeit ist die DNA Synthese kontinuierlich, jeder Replikationszyklus folgt unmittelbar dem vorhergehenden. In Bezug auf den Teilungszyklus ist der Replikationszyklus um eine halbe Generationszeit verschoben (Helmstetter, 1967).

### Chemikalien

Zellproben wurden zum Zählen in Saline (1 : 100) verdünnt. Sie enthält 0.9 %  $\text{NaCl}$  + 0.05 % Formaldehyd oder  $10^{-4}$  M Merthiolat.

Penicillin G (100 000 I.E.) von Daelenberg & Co., Göttingen.  
Streptomycin von Bayer, Leverkusen. Nalidixinsäure, Winthrop  
Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, Mitomycin C von Calbiochem,  
Los Angeles, Calif., USA.

Lösungen der einzelnen Substanzen wurden jeweils unmittelbar vor  
der Benutzung hergestellt.

### Synchronisation

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurde eine Synchronisierungstechnik  
angewendet, die von Helmstetter und Cummings (1964) entwickelt wurde.  
Eine wachsende Bakterienkultur wird auf einem Membranfilter (Millipore)  
gesammelt, an das die Zellen fest adsorbieren. Bei einem kontinuier-  
lichen Fluß von frischem warmem Medium durch die Membran wachsen die  
Zellen weiter, und junge Zellen werden von der Membran abgespült. Die  
Voraussetzung dafür ist, daß alle Adsorptionsstellen auf der Membran  
abgesättigt sind, so daß nach einer Zellteilung die eine Tochterzelle  
an der Oberfläche adsorbiert bleibt, während die andere abfällt. Diese  
Technik ermöglicht eine äußerst schonende Synchronisation von Bakterien  
ohne meßbare Störung ihres Zellmetabolismus.

Nach 7 - 10 Generationen exponentiellen Wachstums von E. coli B/r  
in Glucose-Minimalmedium wurden 150 ml Kultur ( $7 - 9 \times 10^7$  Zellen/ml)  
durch ein 15 cm großes Millipore Membranfilter gesaugt (Porengröße 0.22  $\mu$ m)  
und mit 150 ml vorgewärmtem Medium nachgewaschen. Danach wurde die Membran,  
an der die Bakterien fest hafteten, umgedreht und mit Medium überschichtet.

Durch eine hohe Durchflußrate während der ersten 30 min ( $\sim 50$  ml/min) wurden überschüssige Bakterien von der Membran abgespült. Die Durchflußrate während des Sammelns junger, kleiner Zellen betrug 10 ml/min. Die Temperatur an der Membran wurde durch einen Thermostaten mit angeschlossenen Temperaturfühler geregelt.

Alle frisch geteilten Zellen wurden in einem eiskühlten Behälter aufgefangen. Nach 60 - 90 Minuten wurde das eiskalte Medium, das nur junge Zellen enthielt, noch einmal durch ein  $0.22 \mu$  Millipore Filter filtriert, das vorher mit kochendem destilliertem Wasser gewaschen worden war. Danach wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert und dabei etwa 10 x konzentriert. Das Sammeln der jungen Zellen in einem eiskalten Gefäß hat keinen Einfluß auf die Güte der Synchronisation. Nach der Resuspension in warmem Medium laufen alle Zellprozesse sofort mit normaler Rate weiter.

Die auf diese Weise gewonnenen Zellkulturen haben eine Dichte von  $3 - 8 \times 10^7$  Zellen/ml. In Glucose-Minimalmedium, in der die Generationszeit 42 - 45 min beträgt, bleibt die Zellzahl der synchronisierten Kultur konstant für etwa 28 min. Während dieser Zeit nimmt das Volumen der Zellen kontinuierlich zu. Danach erfolgt für etwa 24 min ein Anstieg der Zellzahl. Die Hälfte der Population hat sich bei 42 - 45 min geteilt. Daraus errechnet sich eine Streuung in der Generationszeit individueller Bakterien von 14 - 17 min. Das ist in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von Powell (1956), der die Teilung individueller Bakterien beobachtete und eine Streuung um  $1/3$  der Generationszeit fand. Das heißt, daß diese Synchronisationstechnik optimale Synchronisation ergibt.

### Messung der Zellzahl und der Zellerfülle

Die Zellzahl wurde mit einem modifizierten Coulter Counter bestimmt. Eine 30  $\mu$  Coulter-Pore ist über einen Vorverstärker und einen Linear-Verstärker mit Pulsformer mit einem Vielkanalanalysator verbunden. Die beim Durchgang eines Bakteriums durch die Pore registrierte Spannungsänderung ist proportional zum Volumen. Die pro Zeiteinheit registrierten Impulse werden integriert und daraus die Zellkonzentration der einzelnen Proben bestimmt.

### Herstellung eines hochtitrigen Phagen-Lysats

In 500 ml TY-Medium wuchs CP 63 auf  $4 \times 10^9$  Zellen/ml und wurde mit T4 in einer Multiplizität von  $10^{-1}$  infiziert. Nach 6 - 7 Stunden trat Lyse ein, die durch Zugabe von Chloroform vervollständigt wurde. Das Lysat wurde für mehrere Stunden bei 4° belassen, danach die Zellreste abzentrifugiert. Die Phagenpartikel sedimentierten bei 12 000 rpm (Sorvall RC-E Rotor SS34) in 3 - 4 Stunden. Sie wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^{12}$ /ml in Phagenpuffer aufbewahrt.

### Anti T4-Antiserum

T4 ( $2 \times 10^{12}$  ml) wurde 1 : 1 mit Dacto Freund's incomplete Adjuvant (Difco) im Homogenisator gemischt, davon je 0,5 ml intramuskulär in beide Hinterläufe von Kaninchen gespritzt. Die Injektion wurde nach 10 Tagen wiederholt und eine Woche später etwa 50 ml Blut entnommen. Sieben Tage vor jeder weiteren Blutentnahme wurde eine zusätzliche Antigen-Injektion vorgenommen. Der K-Wert des Serums betrug K=160.

### Colicin E2 Präparation

Exponentiell wachsende Zellen von E. coli CA-42 (E2) wurden bei einer Zelldichte von  $2 - 4 \times 10^8$  /ml für 4 Stunden bei  $37^\circ$  mit Mitomycin C ( $0.5 - 1 \mu\text{g/ml}$ ) induziert. Danach wurde Chloroform zu der Kultur gegeben, das Gemisch für einige Minuten heftig geschüttelt und über Nacht bei  $4^\circ$  stengelassen. Durch Zentrifugieren wurden die Zellen entfernt. Die so gewonnene E2-Präparation enthielt  $2 - 5 \times 10^{12}$  Tötungseinheiten (KU) /ml. Einer Tötungseinheit entsprechen etwa 100 Colicinmoleküle (Jacob et al., 1952).

Die Inaktivierungsreaktion des Colicins wurde nach der Methode von Maeda und Nomura bestimmt (Maeda u. Nomura, 1966).

### Elektronenmikroskopie

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in  $\text{OsO}_4$  (1.5 %) +  $\text{Ca}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (1.65 %) resuspendiert. Nach 2 Stunden Einwirkung wurde in der Kühlzentrifuge bei  $4^\circ$  zentrifugiert und der Bodensatz in Agar eingeschlossen (Kellenberger und Ryter, 1964). Der Agar wurde in Blöckchen von etwa 1 mm Kantenlänge zerteilt, daran schloß sich eine Nachkontrastierung bzw. Fixierung mit 1 % wässriger Uranylacetat-Lösung an. Die Entwässerung erfolgte über aufsteigende Aceton- oder Alkoholkonzentrationen.

Die Einbettung erfolgte in Vestopal B über Styrol-Zwischenbäder oder in Epon 812 (Schuchardt, München). Mit dem OM-U2 von Reichert mit Diamant oder Glasmesser wurden Dünnschnitte angefertigt, die auf Trägernetze mit Kohlefolien übertragen wurden. Die Schnitte wurden im Elmiskop I mit Objektraumkühlung bei 60 - 80 kV untersucht und auf Agfa-Filme (Scientia) aufgenommen.

## ERGEBNISSE

Bei den vorliegenden Untersuchungen der Teilungsphase von E. coli wird davon ausgegangen, daß die Vorgänge, die während dieser Periode ablaufen, morphogenetische Prozesse sind, die Veränderungen in den verschiedenen Schichten der Zellhülle bewirken. Es werden deshalb zunächst die Effekte untersucht, die verschiedene Agenzien, die mit der Zelloberfläche reagieren, auf wachsende Bakterien ausüben. In einem ersten Typ von Experiment werden deshalb Zellen verschiedenen Alters einer kurzen Behandlung (Puls) mit dem jeweiligen Agens ausgesetzt und danach die Zahl der Überlebenden als Funktion des Zellalters bestimmt. Mit diesen Versuchen werden einzelne Schritte der Teilungsphase erfaßt.

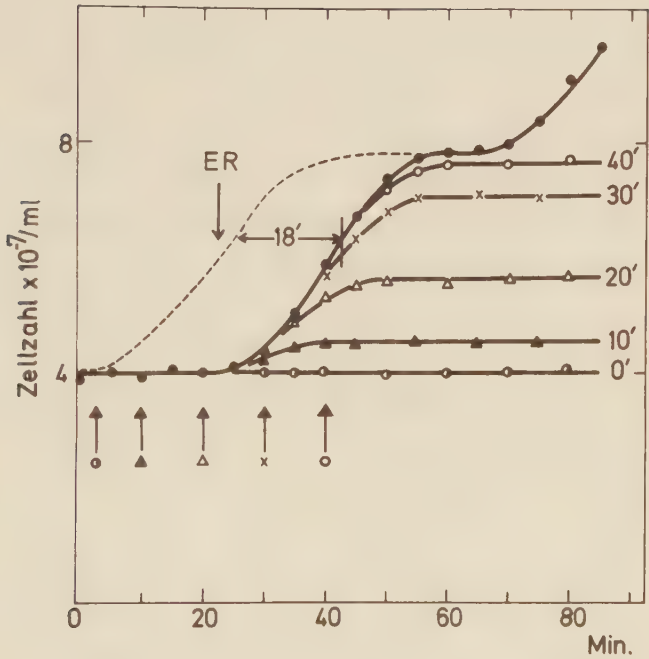
In einem zweiten Typ von Experiment wird der Zusammenhang zwischen dem Prozeß der DNA Replikation und dem Teilungsprozeß untersucht. Dabei geht es um die Frage, ob auch die einzelnen Teilungsschritte in direkter Weise abhängen von der Beendigung einer Replikationsrunde. Eine allgemeine Abhängigkeit der Teilung vom Replikationsende wurde bereits nachgewiesen (Clark, 1968; Helmstetter, 1967).

In einem weiteren Typ von Experiment wird der Zusammenhang der Teilungsschritte untereinander untersucht.

### Bestimmung des Endes einer Replikationsrunde

Die Zellteilung hängt von der vorhergehenden Beendigung einer Replikationsrunde ab, während die DNA Synthese auch ohne Teilung weitergehen kann (Clark, 1968; Helmstetter und Pierucci, 1968; Pierucci, 1969). Das Replikationsende markiert den Zeitpunkt und das Ereignis, von dem der biochemische und morphologische Prozess, der gewöhnlich in der Trennung der Tochterkeime endet, seinen Anfang nimmt und ausgelöst wird. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, in allen Versuchen, in denen einzelne Schritte des Teilungsprozesses gemessen werden, gleichzeitig den Zeitpunkt des Replikationsendes zu bestimmen, um eine genaue Zeitrelation herstellen zu können.

Das Replikationsende in synchron wachsenden Kulturen von E. c. B/r/1 wird durch Zugabe von Nalidixin Säure zu verschiedenen Zellaltern gemessen (Fig. 1). Nalidixin Säure hemmt spezifisch die DNA Synthese (Goss et al., 1965; Eberle und Masker, 1971), während die Proteinsynthese nicht behindert wird. Da die Zellen sich nicht gleichzeitig teilen (siehe Material und Methoden), gibt es auch für alle anderen Zellprozesse eine zeitliche Streuung. Zugabe von Nalidixin Säure bei 10 min erlaubt die Teilung bei nur wenigen Zellen, da der größte Teil das Replikationsende noch nicht erreicht hat. Nach Hemmung der DNA Synthese bei 30 min können jedoch die meisten Zellen eine Teilung ausführen, da sie die vorhergehende Replikationsrunde beendet haben. Aus der Höhe der Restteilung nach Zugabe von Nalidixin Säure kann für jedes Zellalter der Anteil der Zellen berechnet werden, die bereits das Replikationsende erreicht haben. Die Zeit, bei der sich im Durch-



Figur 1. Bestimmung des Replikationsendes mit Nalidixin Säure. Zu den mit Pfeilen angegebenen Zeiten werden 0,3 ml Proben aus der synchronen Kultur entnommen und zu 0,3 ml Medium gegeben, das 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Nalidixin Säure enthält. Das Gemisch wird bei 37° weiter inkubiert, und die Zellzahl jeder Probe wird fortlaufend bestimmt. Aus der Höhe der Restteilungen nach Zugabe von Nalidixin Säure kann für jedes Zellalter der Anteil der Zellen berechnet werden, der bereits das Ende der Replikationsrunde erreicht hat (unterbrochene Linie). Kontrollkultur = ●.

schnitt ein Bakterium teilt, bzw. das Replikationsende erreicht, wird den Wendepunkten der Kurven entnommen. In Figur 1 liegt der Zeitpunkt der Teilung bei einem Zellalter von 45 min, das Replikationsende erfolgt bei 27 min.

#### Empfindlichkeit von Bakterienzellen auf Penicillin

Die Hauptkomponente der bakteriellen Zellwand ist ein sackförmiges Riesenmolekül (Mureinsacculus), das die Zelle wie ein Netz umgibt und ihr die typische Form und mechanische Stabilität gibt (Weidel und Pelzer, 1964; Braun und Schwarz, 1969; Schwarz und Leutgeb, 1971). Das Murein besteht aus 1-4  $\beta$  verknüpften Polysaccharidketten, in denen die beiden Aminozucker N-acetyl-glucosamin und N-acetylmuramin Säure alternieren. Untereinander sind die Polysaccharide, durch kurze Peptidbrücken verbunden, in denen eine begrenzte Anzahl von Aminosäuren auftritt (Ghuysen et al., 1968).

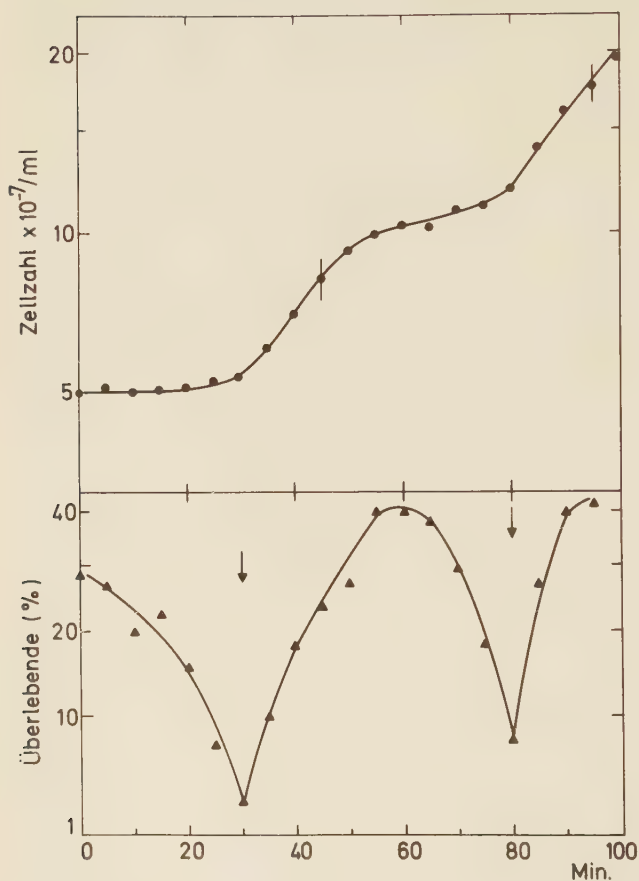
Die Vergrößerung des Mureinsacculus während des Zellwachstums wird durch das Zusammenwirken von mureinhydrolisierenden und mureinsynthetisierenden Enzymen erreicht (Strominger et al., 1967; Ghuysen, 1969; Brown und Young, 1970). In einer ersten Reaktion werden kovalente Bindungen im Murein aufgebrochen und dadurch Raum und Rezeptoren geschaffen, um in einer zweiten Reaktion mit Hilfe von Transpeptidasen neue Vorstufen in das Polymer einzufügen. Bei verschiedenen Bakterienarten konnte nachgewiesen werden, daß die Wachstumsrate der Zellwand nicht gleichmäßig ist in den

verschiedenen Oberflächenbereichen, sondern in der Zentralregion der Zelle, wo später die Teilung erfolgt, erhöht ist (Cole und Hahn, 1962; Cole, 1965; Shockman et al., 1967; Schwarz et al., 1969).

Von Penicillin konnte gezeigt werden, daß es die zweite Reaktion, in der Vorstufen in den wachsenden Mureinsacculus eingefügt werden, behindert (Lederberg, 1956; Rogers und Mandelstam, 1962). Deshalb zerstören die unter Penicillineinwirkung aktiv bleibenden antolytischen Enzyme die mechanische Stabilität des Mureinsacculus (Leutgeb und Schwarz, 1967), so daß die Zelle schließlich lysiert. Mithin ist die Empfindlichkeit von Zellen gegen die Einwirkung des Penicillin ein Maß für die Aktivität von Zellwand-Hydrolasen.

#### Pulse von Penicillin mit synchronen Bakterienzellen

Aufgrund seiner Eigenschaften bietet sich Penicillin als ein Mittel an, die Aktivität von Hydrolasen im Zellzyklus zu messen. Es ist für die Versuche die Beobachtung wesentlich, daß Penicillin in Abhängigkeit von seiner Konzentration unterschiedliche Wirkspezifitäten hat. Es wurde gezeigt, daß bei geringen Penicillinkonzentrationen (weniger als 100 I.E./ml) hauptsächlich die Zellteilung verhindert wird, und die Bakterien daher zu Filamenten auswachsen (Schwarz et al., 1969). Bei Pulsen mit 1000 I.E./ml Penicillin kann erwartet werden, daß spezifisch die Zellwand-Synthese gehemmt wird, die in der Zentralregion des Bakteriums zur Synthese der Polkappen der Tochterzellen führt, und nur in geringem Maße auch die für das Längenwachstum erforderliche Synthese.



Figur 2. Penicillin-Empfindlichkeit als Funktion des Zellalters. Penicillin G wird mit einer Endverdünnung von 1000 I.E./ml im Abstand von 5 min zu Zellproben aus einer synchronen Kultur von *E.c.B/r/1* gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wird jeweils ein Teil der Zellen rasch 1 : 100 in eiskaltes Medium verdünnt und darin für 1 - 2 Stunden belassen. Kolonieformende Bakterien werden nach Ausstreichen auf TY-Platten gezählt. Die Pfeile geben den Zeitpunkt höchster Penicillin-Empfindlichkeit an.  
● = Kontrolle, ▲ = Prozent Überlebende Zellen.

Das Auftreten erhöhter Enzymaktivität in der Zentralregion wird als Funktion des Zellalters gemessen (Fig. 2). Nach 2 min Behandlung synchroner Zellen mit 1000 I.E./ml Penicillin werden die Zellen schnell in eiskühles Medium verdünnt. Diese Behandlung wird die Zerstörung derjenigen Zellen bewirken, die während der Penicillinbehandlung durch erhöhten Zellwandmetabolismus eine labilere Mureinstruktur haben. Die überlebenden Zellen werden auf Agarplatten ausgestrichen und nach weiterer Inkubation als Kolonien gezählt.

Aus Figur 2 ergibt sich, daß es eine Zeit im Zellzyklus gibt, bei der die Zellen empfindlicher werden gegen die Penicillineinwirkung, und daß diese Empfindlichkeit eine Funktion des Zellalters ist. Die Zahl der Überlebenden beträgt kurz nach der Teilung bei einem Zellalter von 0 min 30 %. Das zeigt, daß Pulse mit 1000 I.E./ml Penicillin in geringem Maße auch das allgemeine Zellwachstum stört. Durch die stärkere spezifische Wirkung nimmt mit zunehmendem Zellalter die Fähigkeit der Zellen ab, der Penicillineinwirkung zu widerstehen. Ein Minimum von 2 % an überlebenden Zellen findet sich bei 30 min. Das Ende der Chromosomenreplikation und die Zellteilung, die gleichzeitig in der Kontrollkultur gemessen werden, werden bei 25 min bzw. 45 min gemessen. Mithin erfolgt die Aktivierung der für die Zellwandsynthese nötigen autolytischen Enzyme etwa 5 Minuten nach dem Ende der Chromosomenreplikation und 15 min vor der nächsten Teilung. Diese Zeiten ergeben sich im gleichen Experiment auch für die 2. Generation. (In verschiedenen Experimenten streut die Zeit, die zwischen dem Replikationsende und der Penicillin-Empfindlichkeit vergeht, zwischen 2 min und 10 min).

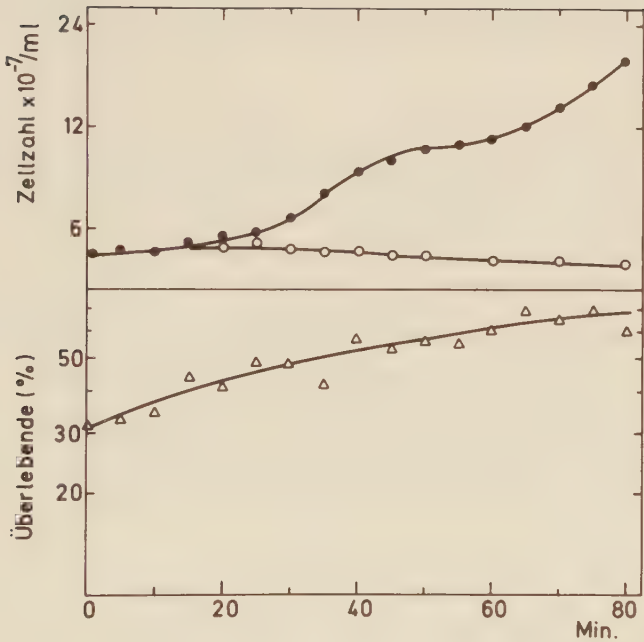
### Abhängigkeit der Penicillinempfindlichkeit vom Replikationsende

Der Nachweis einer kausalen Beziehung zwischen der DNA Replikation und der Aktivierung spezifischer Mureinhydrolasen erfolgt mit Hilfe einer *E. coli* Mutante. *E. coli* B/r-301 dnaB hört bei Erhöhung der Temperatur auf 42° sofort mit der DNA Replikation auf, während die Proteinsynthese mit normaler Rate weitergeht.

Nach der Synchronisation bei 33° wird die Kultur bei 0 min auf die nicht-permissive Temperatur gebracht. Zu dieser Zeit hat noch keine Zelle das Replikationsende erreicht, infolgedessen nimmt der Zelltiter nicht mehr zu.

Zur Zeit 0 min überleben 30 % der Zellen. Mit zunehmendem Zellalter erfolgt keine Abnahme der Zahl der Überlebenden, wie es unter Bedingungen normaler DNA Replikation beobachtet wird. Vielmehr steigt der Zelltiter leicht an (von 30 % auf etwa 60 %).

Demnach besteht zwischen dem Replikationsende und der Zellwandsynthese, die zur Teilung der Tochterkeime führt, eine Abhängigkeit. Letztere kann nur bei einer vorhergehenden erfolgreichen Beendigung einer Replikationsrunde initiiert werden.



Figur 3. Penicillin-Empfindlichkeit nach Hemmung der DNA-Synthese. *E. coli* B/r-301 dnaB wird zur Zeit 0 min auf 42°C gebracht und die Zellzahl bestimmt = ○. Eine Kontrollkultur wird bei 33°C inkubiert = ●. Zu Proben der 42°C-Kultur wird alle 5 min Penicillin G in einer Endkonzentration von 1000 I.E./ml gegeben und bei 42°C für 2 min inkubiert. Danach wird ein Teil der einzelnen Proben 1 : 100 in eiskaltes Medium verdünnt. Nach einer weiteren Stunde wird ausplattiert und die überlebenden Zellen gezählt = Δ.

### Inaktivierung von *E. coli* B/r nach Infektion mit dem Bakteriophagen T4

Der Bakteriophage T4 adsorbiert an bestimmte Komponenten der äußeren Zellhülle von sensitiven Bakterien (Fabricant und Kennell, 1970; DePamphilis, 1971) und tötet dadurch die Zelle. Der Wirkmechanismus dieser Inaktivierung wird später diskutiert werden.

Jeweils ein einziger Phage reicht aus, um die ganze Zelle zu zerstören. An der Tötungsreaktion ist maßgeblich die Proteinhülle des infizierenden Phagen beteiligt (Silver et al., 1968; Duckworth, 1970).

In dem Versuch, der in Fig. 4 gezeigt wird, verwenden wir T4 am182, der normal an den Stamm *E. coli* B/r/1 adsorbiert, aber nicht fähig ist, sich auf diesem Stamm auch zu vermehren, da er in einer früh im Vermehrungszyklus erforderlichen Funktion mutiert ist. Das Fehlen von Phagenvermehrung ist eine wichtige Voraussetzung in unserem System, in dem eine spätere Reinfektion ausgeschlossen sein muß.

Bei verschiedenen Zellaltern werden aus der synchron wachsenden Kultur Proben entnommen und mit einer konstanten Phagenkonzentration infiziert. Da wir mit hohen Zellkonzentrationen arbeiten (gewöhnlich  $3 - 7 \times 10^7$  Zellen/ml), ist die Rate der Phagenadsorption hoch. Bei einer "input" Multiplizität von 10 Phagen pro Bakterium wird innerhalb von 2 min eine effektive Multiplizität (Zahl der tatsächlich adsorbierten Phagen pro Bakterium) von 4 - 5 erreicht. Nach 2 min wird die Reaktion durch 1 : 100 Verdünnung in eiskaltes Medium oder durch anti-T4-Antiserum gestoppt. Die effektive Multiplizität (m) ergibt sich aus der Prozentzahl der Überlebenden nach dem 0 Term der Poisson-Verteilung:

$$P_{(o)_a} = e^{-m} \quad (1)$$

Wie Figur 4 zeigt, nimmt die Zahl der überlebenden Zellen bei zunehmendem Zellalter ab von 1.8 % auf 0.8 %, da sich die Zelloberfläche vergrößert und dadurch mehr Phagenrezeptoren ausgebildet werden, d.h. die effektive Multiplizität nimmt zu.

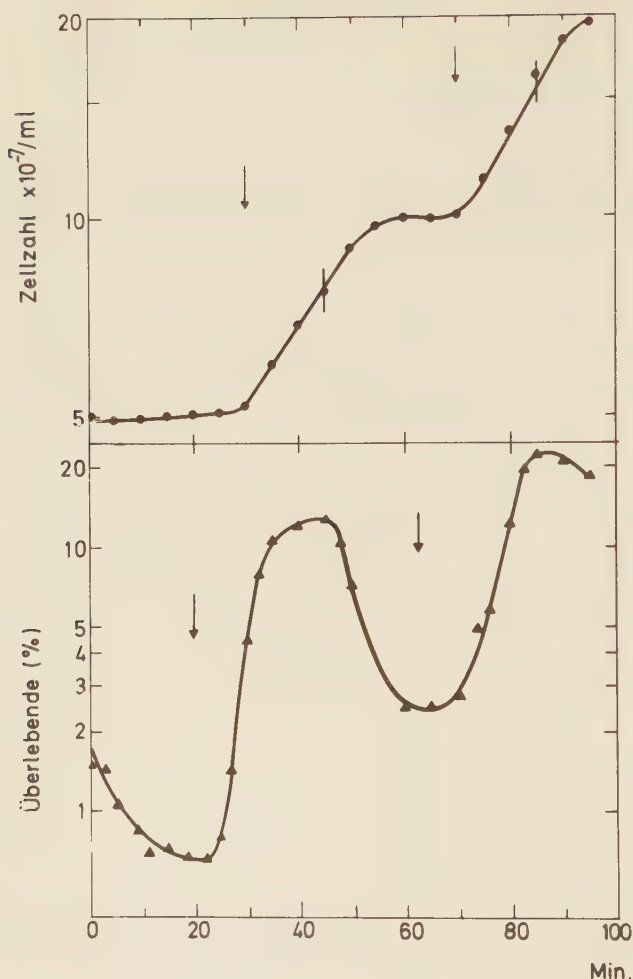
Bei einem Zellalter von 20 min dagegen gibt es einen plötzlichen Anstieg des Zelltiters auf 12 % bei 45 min. Das ist der Zeitpunkt, zu dem sich die Kontrollkultur teilt. Danach nimmt die Zahl der Überlebenden wieder ab.

Diesen plötzlichen Anstieg an überlebenden Zellen wird man erwarten, wenn zu dieser Zeit nicht mehr ein einziger Phage ausreicht, um eine koloniebildende Einheit zu zerstören, sondern dazu mindestens 2 Phagen nötig sind. Das aber heißt, daß die Inaktivierung von einer 1-Treffer- zu einer 2-Treffer-Kinetik wechselt. In diesem Fall muß Formel (1) abgewandelt werden zu:

$$P_{(o)_b} = 1 - (1 - e^{-\frac{m}{2}})^2 \quad (2)$$

Aus dem Verhältnis von (1) und (2) ergibt sich die Höhe des Anstiegs an überlebenden Zellen bei gegebener Multiplizität der Infektion:

$$\frac{P_{(o)_b}}{P_{(o)_a}} = \frac{1 - (1 - e^{-\frac{m}{2}})^2}{e^{-m}} = 2e^{\frac{m}{2}} - 1 \quad (3)$$



Figur 4. Überlebende Zellen nach Infektion mit T4 am<sup>182</sup> als eine Funktion des Zellalters. Eine Probe aus einer synchronen Kultur von E. coli wird alle 5 min mit  $5 \times 10^7$  Phagen/ml infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 2 min wird die Reaktion durch 1 : 100 Verdünnung in eiskaltem Medium gestoppt. Koloniebildende Zellen werden gezählt und als Prozent Überlebende der Kontrolle gegen das Zellalter abgetragen, zu dem die Bakterienproben mit T4 am<sup>182</sup> infiziert wurden =  $\blacktriangle$ . Kontrollkultur =  $\bullet$ . Die Pfeile markieren jeweils den Beginn der Zellteilung bzw. den Beginn des Anstiegs an Überlebenden (siehe Text).

Nach der Gleichung (3) wird bei einer Multiplizität von 4 ein Anstieg um den Faktor 13,8 erwartet. Das ist etwa in Übereinstimmung mit dem experimentell gefundenen Wert von 15,0 in Fig. 4. In Tabelle I wird die Höhe des Anstiegs für einige andere Multiplizitäten gezeigt. Die effektive Multiplizität wird jeweils aus der Überlebensrate kurz vor dem Anstieg bestimmt.

Es ist nicht ohne weiteres möglich, aus dem Wendepunkt der Überlebenskurve den genauen Zeitpunkt zu mitteln, an dem ein mittleres Bakterium aus zwei Tötungseinheiten für T4 besteht. Dagegen lassen sich der Beginn des Anstiegs wie auch der Beginn der Zellteilung der Kontrollkultur hinreichend genau definieren, so daß es zweckmäßig ist, diese beiden Punkte zu vergleichen.

Der Anstieg der Überlebenden wird in Fig. 4 bei 20 min (siehe Pfeil) gemessen, der Beginn der Teilung der Kontrolle bei 30 min. Mithin vergeht eine Zeitspanne von 10 min zwischen dem ersten Erscheinen von Zellen, die für T4 zwei Tötungseinheiten darstellen, und dem Auftreten der ersten eben geteilten Zellen. Der Zeitpunkt, bei dem ein mittleres Bakterium das Replikationsende erreicht, liegt bei 25 min und der Zeitpunkt, bei dem sich ein mittleres Bakterium teilt bei 45 min. Als mittlere Zeit für die Ausbildung der Barriere gegen das Tötungssignal von T4 ergibt sich daraus ein Alter von 35 min.

| m   | Zunahme an Überlebenden |         |
|-----|-------------------------|---------|
|     | berechnet               | im Exp. |
| 0.5 | 1.5                     | 1.8     |
| 1   | 2.3                     | 2.8     |
| 2   | 4.4                     | 5.3     |
| 4   | 13.8                    | 15.0    |

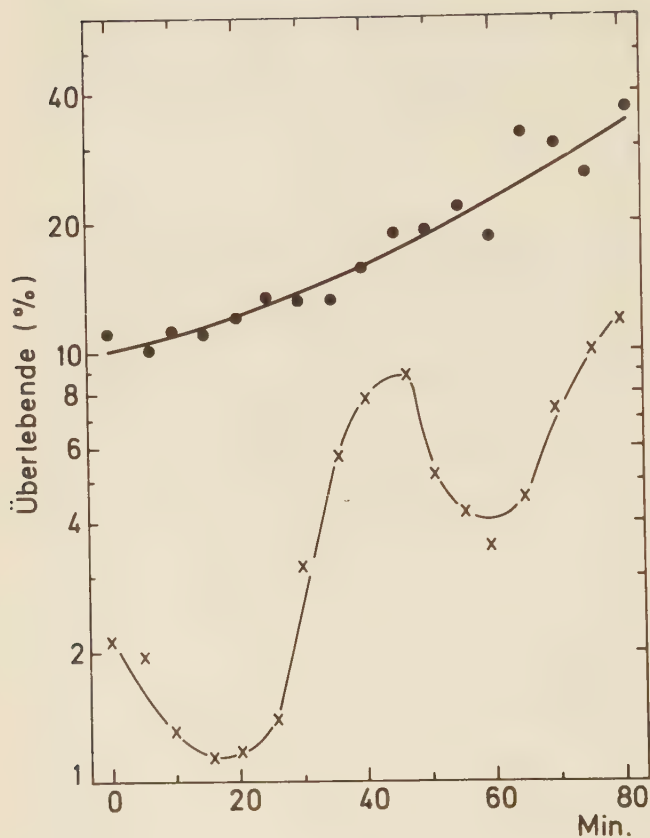
Tabelle I. Anstieg der Überlebenden bei verschiedenen  
Multiplizitäten der Infektion (m).

### Die Phagenaufnahme variiert nicht während des Teilungszyklus

Der Anstieg an überlebenden Zellen während des synchronen Wachstums der Bakterienkultur beruht nicht darauf, daß die Phagenadsorption zu einem bestimmten Zeitpunkt der Wachstumsphase erschwert ist und dadurch weniger Zellen getötet werden. Das wird in Fig. 5 gezeigt.

Wie zuvor wird der synchron wachsende Stamm E. coli B/r/1-231 für 2 min mit einer Konzentration von T4 inkubiert, die das Überleben von 2 % der Zellen zur Zeit 0 min erlaubt ( $m = 3.8$ ). Danach wird ein Teil des Gemisches verdünnt, ausplattiert und dient als Kontrolle. Das verbleibende Reaktionsgemisch wird gleichzeitig versetzt mit Zellen des Stammes E. coli B/r-301, die aus einer exponentiell wachsenden Kultur genommen werden. Im Gegensatz zu E. coli B/r/1-231 ist E. coli B/r-301 streptomycin-resistent und dient als Indikator für nicht adsorbierte Phagenpartikel.

Nach weiteren 4 min Inkubationszeit mit E. coli B/r-301, die die Adsorption der noch im Überstand verbliebenen Phagen ermöglicht, wird die Reaktion gestoppt und eine geeignete Zellzahl auf TY-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Streptomycin enthalten, so daß nur E. coli B/r-301 wächst. Falls die Adsorption des Phagen in der synchronen Kultur während einer bestimmten Phase der teilungssynchronen Zellen erschwert ist, und dadurch zeitweise mehr Phagen im Überstand bleiben, sollte es eine diskontinuierliche Überlebenskurve von E. coli B/r-301 geben. Das aber wird nicht beobachtet. Vielmehr nimmt der Zelltiter von E. coli B/r-301 kontinuierlich zu, parallel zur Volumenzunahme der Kontrollkultur.



Figur 5. Adsorptionsfähigkeit von T4 am B2 während synchronisierten Wachstums von *E. coli* B/r/1. Nach 2 min Adsorption wird ein Teil des Reaktionsgemisches nach geeigneter Verdünnung ausplattiert und überlebende Zellen gezählt = x. Ein anderer Teil des Reaktionsgemisches wird mit *E. coli* B/r-301 versetzt ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml), 4 min weiter inkubiert und ein Teil der Probe nach Verdünnung auf TY-Platten ausgestrichen, die 50 µg/ml Streptomycin enthalten, und die überlebenden gezählt = ●.

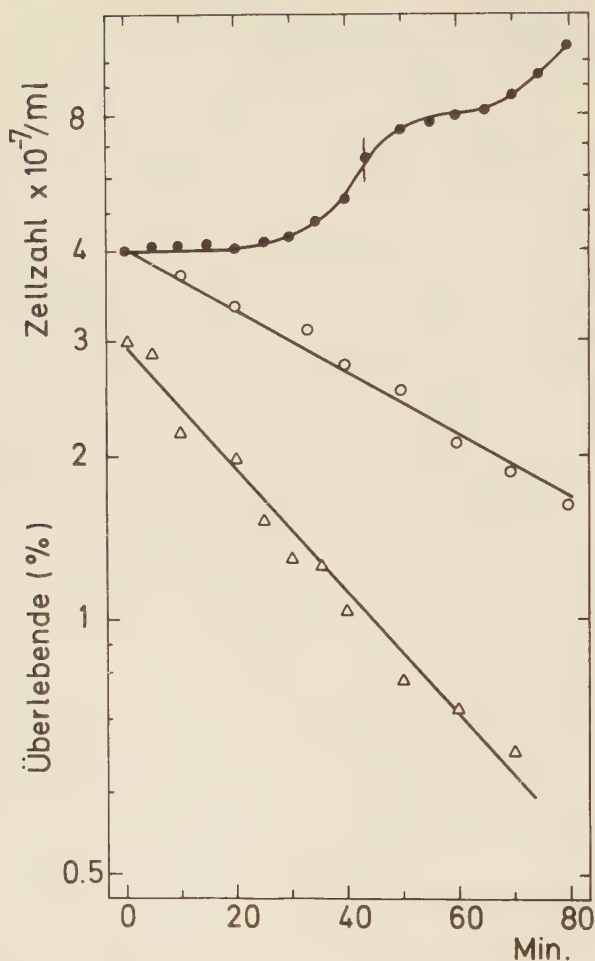
Der Wechsel von einer 1-Treffer- zu einer 2-Treffer-Kinetik nach  
T4 Infektion ist abhängig vom Replikationsende.

Die Herausbildung eines Zellzustandes, der bewirkt, daß durch die Infektion mit einem T4-Phagen nicht mehr der gesamte Organismus getötet wird, sondern nur ein Teil der Zelle, erfolgt durchschnittlich 10 min nach dem Replikationsende. Für eine Beurteilung dieses Schrittes im Teilungsablauf ist es wesentlich, seine Abhängigkeit vom Teilungssignal zu testen, wie bereits ausgeführt wurde.

Deshalb wurde die DNA-Synthese synchron wachsender Bakterien in einer frühen Replikationsphase gehemmt. (Zugabe von Nalidixin Säure zur Zeit 0 min). Aus der replikationsgehemmten Kultur werden fortlaufend Proben entnommen und für 2 min mit T4 amN82 inkubiert. Nach der Verdünnung werden die Überlebenden auf Platten bestimmt (Fig. 6).

Gleichzeitig wird der Zelltiter der mit Nalidixin Säure behandelten Kultur durch Ausstreichen auf Platten bestimmt, und die Überlebenden nach T4 Infektion auf den so bestimmten Zelltiter bezogen.

Die Zahl der Zellen, die die Phageninfektion überleben, beträgt am Anfang 3 % und fällt mit zunehmendem Zellalter auf 0.6 % ab (bei 80 min). Dieser Kurvenverlauf wird erwartet, wenn sich die Trefferkinetik nicht ändert und bei der Volumenzunahme der Zellen, die durch Nalidixinsäure nicht gehemmt wird, pro Zeiteinheit mehr Phagen adsorbieren können.



Figur 6. Inaktivierung von synchronisierten Zellen nach Hemmung der DNA Synthese durch Nalidixin Säure und nach T4 amN82 Infektion. Kontrollkultur = ●. Nalidixin Säure wird bei 0 min zugefügt (10 µg/ml) und die Zahl der Koloniebildner fortlaufend bestimmt = ○. Auf diese Zellzahl werden die Überlebenden bezogen, die nach Infektion mit dem Phagen gezählt werden = Δ. Die Phagen werden in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Partikel/ml für 2 min mit Proben derjenigen Zellkultur inkubiert, die zur Zeit 0 min Nalidixin Säure erhielt.

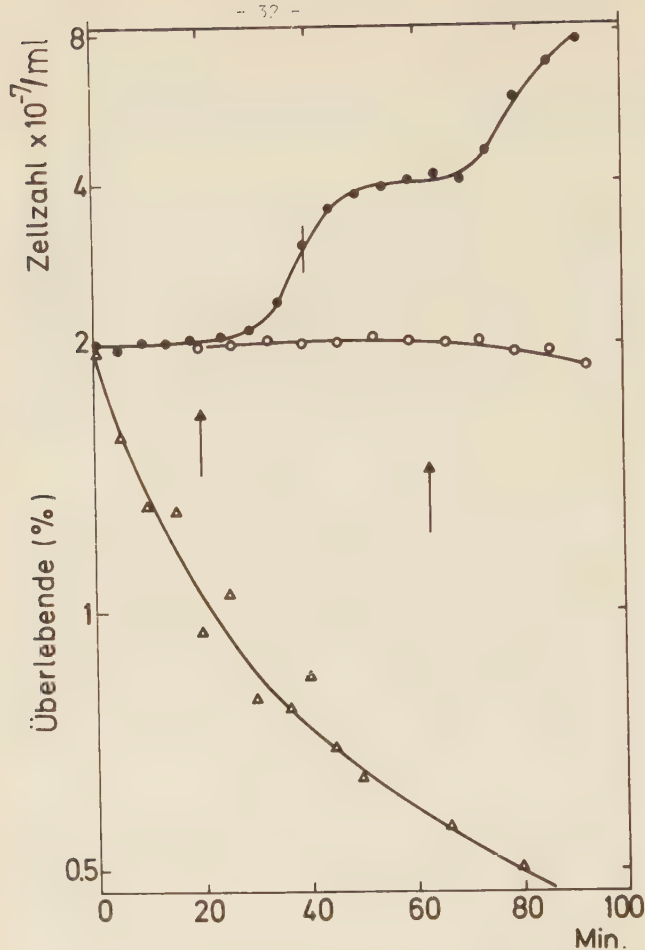
### Abhängigkeit der "T4-Tötungsschranke" vom penicillin-sensitiven Teilungsschritt

Aus den vorherigen Versuchen ergibt sich, daß der Teilungsschritt, der in einem plötzlichen Wechsel der Trefferkinetik während T4 Infektion besteht ("Tötungsschranke"), zeitlich kurz nach dem penicillin-sensitiven Teilungsschritt erfolgt. Das kann auf eine kausale Sequenz der Teilungsschritte hindeuten. Tatsächlich wird durch spezifische Hemmung der Teilung die Bildung der "Tötungsschranke" verhindert (Fig. 7).

10 I.E./ml Penicillin werden dem Wachstumsmedium der synchronen Kultur bei einem frühen Zellalter (0 - 10 min) zugesetzt. Dadurch wird der Teilungsprozess zu dem Zeitpunkt unterbrochen, an dem das für die Bildung der Polikappen spezifische Enzymsystem aktiviert wird. Da die Zellelongation, wie auch die Chromosomenreplikation und -segregation unter diesen Bedingungen nicht gehemmt werden, bilden die Bakterien Filamente.

Das Replikationsende in der Penicillinkultur erfolgt zur normalen Zeit bei 25 min. Es wurde gemessen, indem Zellproben 1 : 10 in Medium verdünnt wurden, das 10 µg Nalidixinsäure enthielt. In dieser Verdünnung hemmt Penicillin nicht mehr die Teilung.

Gleichsinnig mit der Volumenvergrößerung der Zellen fällt die Zahl der Überlebenden nach T4 Infektion rasch ab, von 2 % zur Zeit 0 min auf 0.5 % bei 80 min. Zu dieser Zeit liegen Filamente mit zwei normal verteilten Kernäquivalenten vor. Es ist somit ausgeschlossen, daß die Verdoppelung der Chromosomen verantwortlich ist für die "Tötungsschranke". Vielmehr muß diese durch einen Schritt ausgelöst werden, der durch Penicillin hemmbar ist.



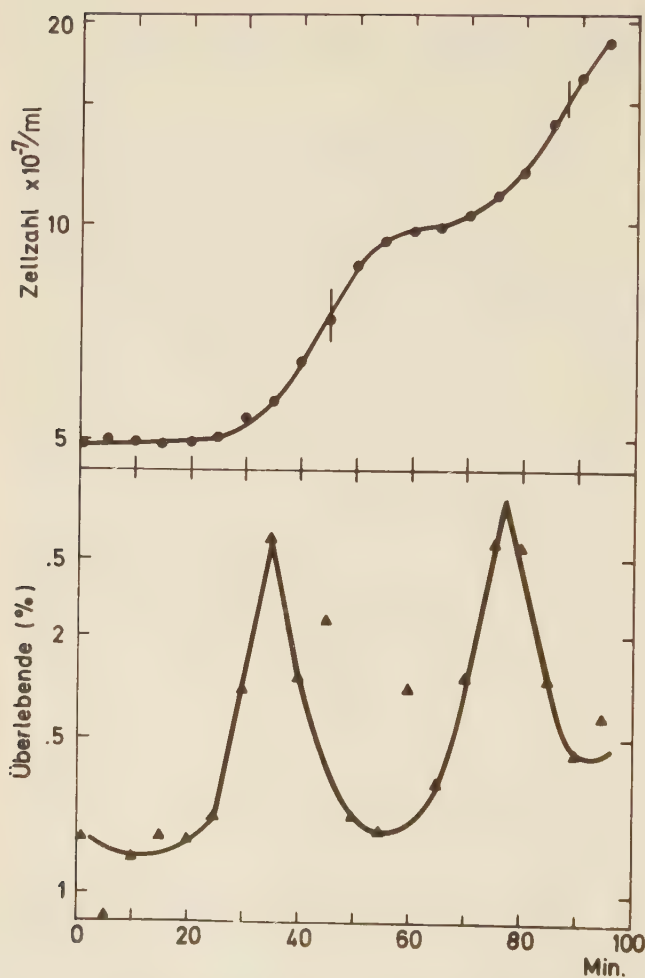
Figur 7. Inaktivierung von synchron wachsenden Zellen nach Hemmung der Teilung und nach T4 amN82 Infektion. Penicillin in einer Endkonzentration von  $10 \text{ I.E./ml}$  wird zur Zeit 0 min in einen Teil der Kultur gegeben und die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt = ○. Der andere Teil der Kultur dient als Kontrolle = ●. Überlebende aus der Penicillin-Kultur nach 2 min Inkubation mit  $4 \times 10^8$  Phagen/ml = Δ. Die Pfeile zeigen die Zeiten an, bei denen in der Penicillin-Kultur das Ende der Replikationsrunde gemessen wird (siehe Text).

### Inaktivierung synchroner Bakterienzellen durch Colicin E2

Colicine sind Proteine, die von bestimmten colicinogenen Stämmen produziert und ins Medium abgegeben werden. Sie besitzen die Eigenschaft, andere sensitive Bakterienstämme zu töten (Frédérin, 1958; Nomura, 1963; Luria, 1964). Von Colicin E1 und E2 konnte gezeigt werden, daß sie unmittelbar mit der cytoplasmatischen Membran reagieren (Maeda und Nomura, 1966; Bhattacharyya et al., 1970). E2 induziert durch seine Adsorption an die Membran den Abbau der Bakterien-DNA (Nomura, 1963). Dieser tödliche Effekt wird bereits durch eine einzige Tötungseinheit (killing-unit = KU) bewirkt. (KU wurde in "Methoden" definiert).

Wegen der direkten Wirkung von E2 auf die Cytoplasma-Membran wird es als Indikator von Membranveränderungen benutzt, die während der Teilungsphase auftreten und Reaktionen in diesem Bereich anzeigen.

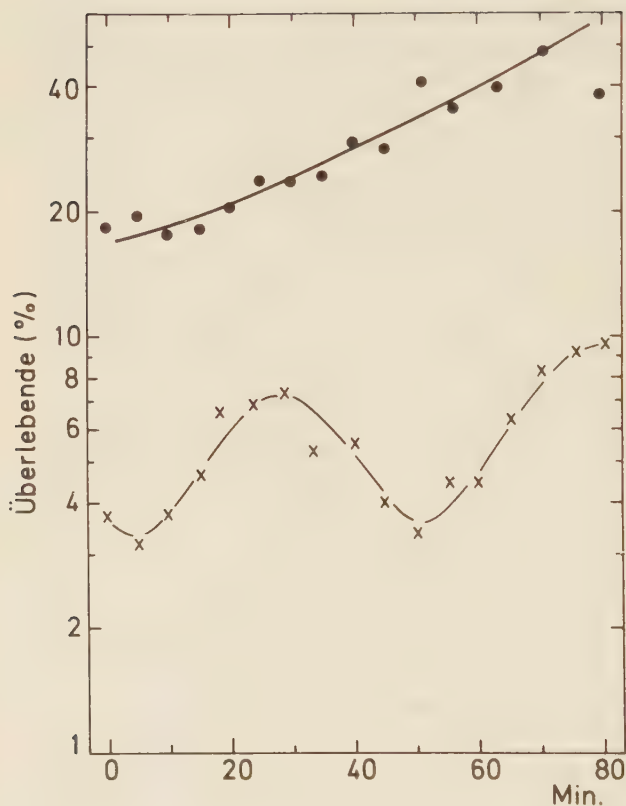
Die Reaktion von E2 mit der Bakterienzelle erfolgt in zwei Stufen (Reynolds und Reeves, 1963; Nomura, 1964). Bis zu 10 min nach der Infektion ist die Reaktion reversibel durch Trypsin, das das in der Membran adsorbierte Colicin abbaut. Danach ist die Degradation der bakteriellen DNA so weit fortgeschritten, daß die Zelle nicht mehr überleben kann. Wir stellten fest, daß die Reaktion während der ersten Stufe auch durch osmotischen Schock oder bei hoher Ionenstärke reversibel ist. Danach scheint die Bindung von E2 an die Membran nicht sehr fest, und leicht durch Ladungsverschiebungen zu lösen sein.



Figur 8. Zahl der Überlebenden Zellen nach Behandlung einer synchronen Kultur mit Colicin E2 als Funktion des Zellalters. Im Abstand von 5 min wird in 0.9 ml Zellprobe 0.1 ml E2-Lösung gebracht, die eine Colicin-Konzentration von etwa  $4 \times 10^{-5}$  KU/ml hat. Die Adsorptionszeit beträgt 2.5 min. Danach wird ein Teil des Gemisches langsam 1 : 100 in Medium verdünnt ( $I = 0.35$ ) und darin bei Raumtemperatur für 30 min belassen. Koloniebildner werden auf TY-Platten gezählt =  $\blacktriangle$ . Kontrollkultur =  $\bullet$ .

Um bei unseren Versuchen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden alle Reaktionen zwischen E.coli D/r/1 in Minimalmedium ausgeführt, dessen Ionenstärke nach Erniedrigung der NaCl-Konzentration  $I = 0.35$  beträgt. Die Verdünnungen des E2-Bakteriengemisches werden in das gleiche Minimalmedium gemacht, das auf Zimmertemperatur gehalten wird. Das Ausplattieren Überlebender Zellen erfolgt nach 30 min auf TY-Platten (Fig. 8). Alle 5 min wird eine Bakterienprobe aus der synchronen Kultur für 2.5 min mit einer E2-Konzentration infiziert, die das Überleben von etwa 1 % der Zellen zur Zeit 0 min erlaubt ( $m = 4.5$ ). Nach einer anfänglichen Abnahme der Überlebenden steigt der Zelltitel auf 2.7 % bei 35 min an. Danach fällt er rasch wieder auf 1.2 % bei 55 min ab. Die Kontrollkultur teilt sich bei 45 min, das Replikationsende wird bei 25 min gemessen. Danach liegt die Zeit relativer E2-Toleranz 10 min nach dem Replikationsende. Diese Toleranz ist jedoch nicht stabil. Bereits vor der Teilung werden die Bakterien wieder sensitiv gegen E2.

In einer Reihe von Experimenten mit verschiedenen Multiplizitäten von E2-Tötungseinheiten ( $m = 1 - 7$ ) wurde festgestellt, daß die Zunahme der E2-Unempfindlichkeit keine Abhängigkeit von der Multiplizität zeigt. Das steht im Gegensatz zu dem Ergebnis, das mit T4 als Tötungagens erhalten worden war (siehe Fig. 4 und Tabelle 1). Die E2-Toleranz beruht also nicht auf einer Veränderung der Trefferkinetik, sondern auf einer veränderten Eigenschaft der gesamten Membran. Von Experiment zu Experiment gibt es größere zeitliche Verschiebungen der altersabhängigen E2-Toleranz (zwischen 5 und 17 min nach dem Replikationsende).



Figur 9. E2-Aufnahme während verschiedener Wachstumsphasen von E.c.B/r/1. Nach Behandlung mit  $1 \times 10^6$  RJU/ml E2 für 2.5 min wird ein Teil des Gemisches verdünnt, ausplattiert und die Zellzahl bestimmt = x. Der andere Teil des Gemisches wird mit E.c.B/r-301 versetzt ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) und für weitere 4 min inkubiert. Die Überlebenden des zweiten Stammes = ● werden auf Platten gezählt, die 50 µg/ml Streptomycin enthalten.

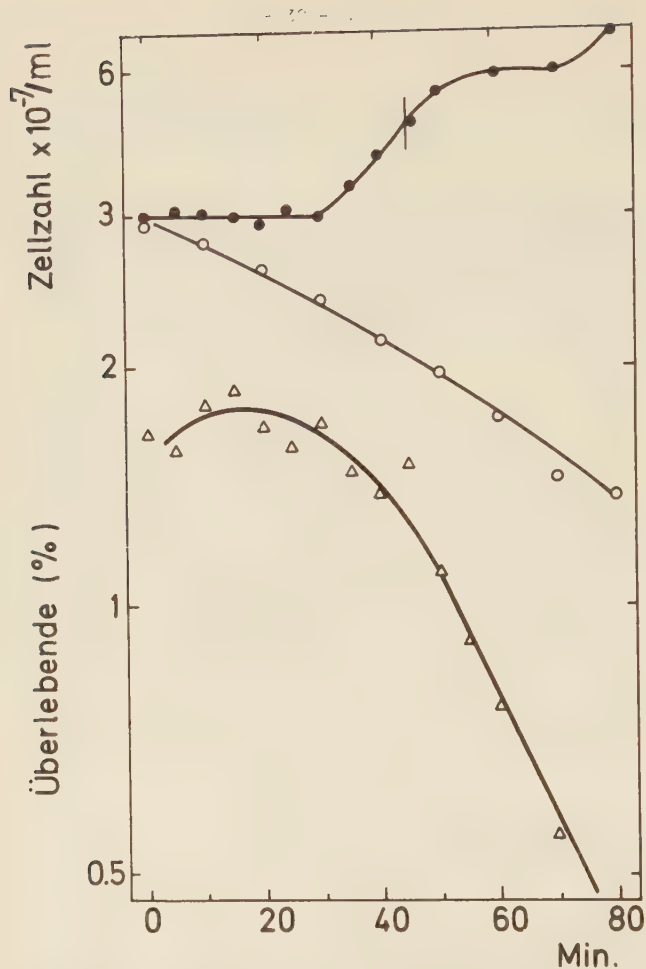
### E2-Toleranz beruht nicht auf einer gestörten Aufnahme des Bakteriocids

Der Anteil der nicht-adsorbierten E2-Moleküle wird nach 2 min Inkubation mit synchronen Zellen von E. coli B/r/1 durch weitere Versetzung mit dem als Indikatorstamm dienenden E. coli B/r-301 bestimmt (Fig. 9), analog den Versuchen mit dem Phagen T4.

In der Zeit, zu der die Kontrollkultur weniger empfindlich ist gegen das Bakteriocid, bei 25 - 35 min, erhält man keine Abnahme der Überlebenden des Indikatorstammes, der erwartet wird, wenn zu dieser Zeit durch erschwerte Adsorption mehr E2 im Reaktionsmedium bleibt. Vielmehr nimmt die Zahl der Überlebenden von E. coli B/r-301 ständig zu, von 8 % auf 40 % in der Zeit von 0 min - 80 min, da während dieser Zeit die effektive Multiplizität durch Vergrößerung der Zelloberfläche der synchronisierten Population zunimmt.

### Hemmung der DNA Synthese verhindert die E2-Toleranz

Nalidixin Säure wird in das Wachstumsmedium zu einer Zeit gegeben, 0 min, zu der das durchschnittliche Bakterium ein halbrepliziertes Chromosom aufweist. Die Endkonzentration von Nalidixin Säure beträgt 10 µg/ml. Die Kontrolle ohne den DNA-Hemmer verdoppelt sich nach 43 min (siehe Fig. 10). Proben aus der replikationsgehemmten Kultur, deren Zelltitler gleichzeitig durch Ausplattierung bestimmt wird, werden zu verschiedenen Zeiten mit E2 infiziert.



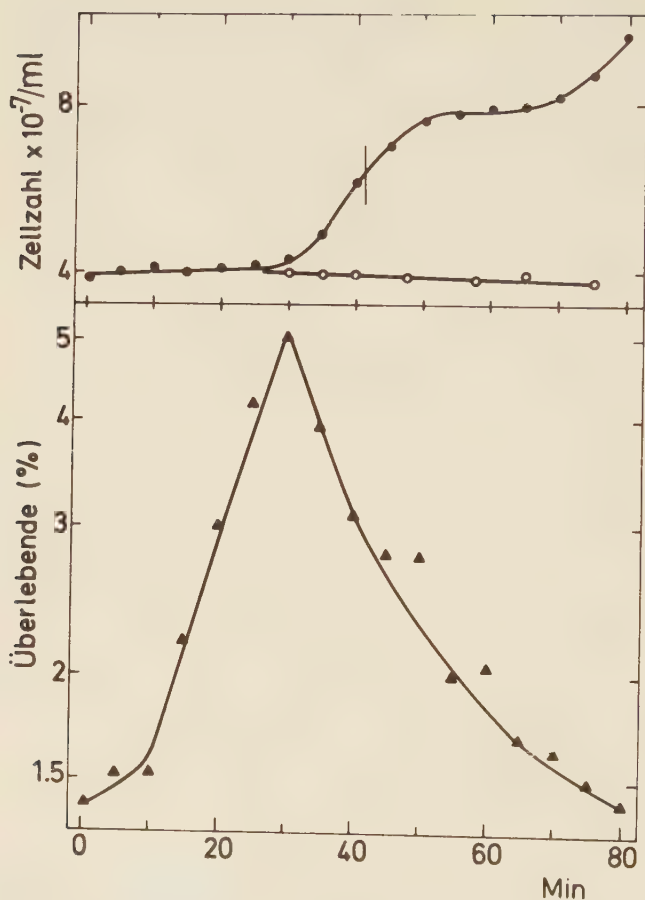
Figur 10. Inaktivierung von synchronen Bakterien nach Hemmung der DNA Synthese und nach E2 Behandlung während verschiedener Wachstumsphasen. Der Zelltitert nach Zugabe von Nalidixin Säure (10 µg/ml) bei 0 min wird durch Ausplattieren bestimmt ○. Kontrollkultur = ●. Die DNA Kultur wird mit  $4 \times 10^9$  KU/ml E2 behandelt und die Zahl der Überlebenden nach 2.5 min Adsorptionszeit bestimmt = △.

Die Zahl überlebender Zellen aus dem Medium mit Validixin Säure nimmt während 80 Min um den Faktor 2,14 ab. In der gleichen Zeit wird ein Abfall der überlebenden Zellen nach E2 Infektion um den Faktor 4 beobachtet. Replikationsstop vor Beendigung der Replikationsrunde hemmt also die Ausbildung der E2-Toleranz, jedoch ist der Effekt nicht so unmittelbar wie bei der T4-Tätungsschranke in Figur 6. Während der ersten 15 min erfolgt noch ein leichter Anstieg an überlebenden Zellen.

#### Colicin-Toleranz tritt auch nach Hemmung der Teilung durch Penicillin auf

Unmittelbar nach der Synchronisation wird die Teilung in einer Hälfte der Kultur spezifisch durch 10 I.E./ml Penicillin gehemmt. Die Kontrollkultur teilt sich bei 42 min, während sich der Zell-titer der Penicillinkultur nicht mehr erhöht. Die Colicin-Unempfindlichkeit dieser Kultur nimmt rasch zu von 1,5 % unmittelbar nach der Teilung auf 5 % bei einem Zellalter von 30 min. Danach nimmt die Zahl der Überlebenden ab und erreicht bei 80 min wieder einen Wert von etwa 1,5 %.

Wir haben keine hinreichende Erklärung dafür, warum wir keine erneute E2-Toleranz während der zweiten Generation messen können, da sowohl die Replikation als auch die Segregation der Chromosomen während dieser Periode normal sind. Das Replikationsende der Penicillinkultur wurde bei 24 min bzw. 66 min gemessen. Allerdings fanden wir, daß nach längerem Wachstum in Penicillin die Bakterien extrem empfindlich werden gegen E2, was einen Toleranzeffekt überdecken mag. Die gleiche erhöhte Empfindlichkeit gegen den tödlichen Effekt von E2



Figur 11. Inaktivierung von synchron wachsenden Zellen nach Hemmung der Teilung und nach Behandlung mit Colicin E2. Die Teilung wird in einem Teil der Kultur durch Zugabe von 10 I.E./ml Penicillin G gehemmt =  $\circ$ . Der andere Teil der Kultur dient als Kontrolle =  $\bullet$ . Zahl der Überlebenden nach 2,5 min Inkubation mit  $4 \times 10^7$  KU/ml E2 =  $\blacktriangle$ .

beobachteten wir, wenn wir dnaB-Mutanten bei nicht permissiver Temperatur infizierten. Bei dnaE wurde ein verändertes Membranprotein festgestellt (Shapiro et al., 1970), das die extreme E2-Empfindlichkeit erklären könnte. Einen Hinweis dafür, daß nach längerer Penicillineinwirkung auch Membraneigenschaften verändert werden, geben Ward und Glaser. Sie fanden, daß die zweite Initiation der Replikation nach der Zugabe des Antibiotikums nicht mehr an allen DNA Strängen erfolgt (Ward und Glaser, 1972).

#### Physiologische und physische Teilung von E. coli B/r/1

Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Teilung in der Trennung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen besteht. Genau genommen ist aber eine Zelle bereits geteilt, sobald Prozesse in einem Teil der Zelle unabhängig werden von Prozessen im anderen Teil der Zelle. Das heißt, daß es vor der eigentlichen Trennung bereits Schritte im Zellzyklus geben kann, die eine Teilung der Zellen bewirken, ohne daß bereits zwei räumlich getrennte Einheiten vorliegen. In diesem Fall kann man von einer physiologischen Teilung sprechen, die vor der physischen erfolgt und eine Zelle in zwei unabhängige Kompartimente zerlegt.

Die Aufteilung eines Bakteriums in zwei Kompartimente kann in der Form einer Septation erfolgen: innerhalb einer geschlossenen Zellohülle wird der Protoplast durch die Bildung eines Septums in zwei Reaktionsräume geteilt. Diese Form der Kompartimentalisierung ist bei gram-positiven Bakterien beobachtet worden (Steed und Murray, 1966; Ryter, 1968). Auch für gram-negative Bakterien ist die Bildung eines Membranseptums als ein Teilungsschritt gefordert worden (Chapman, 1959; Clark, 1968).

Da eine physiologische Teilung in Form eines Membranseptums für die Analyse der Teilungsphase und für eine Definition der Teilung selbst von großer Bedeutung ist, wurden Versuche gemacht, die geeignet sind, Eigenschaften des Septums aufzudecken. Es wird die Permeabilitätseigenschaft des Septums für zwei verschiedene Moleküle untersucht, und zwar für das DNA-Molekül und für Proteine. Dafür wird das genetische System der Rekombination (DNA) und Komplementation (Protein) verwendet.

#### Rekombination von T4 in E.coli B/r/1

Während synchronem Wachstum wird E. coli B/r/1 zu verschiedenen Zellaltern gleichzeitig mit zwei späten Amber-Mutanten von T4 infiziert (am 17, Gen 23 und am 128, Gen 11). Der B-Stamm von E. coli erlaubt keine Vermehrung von einzelnen am-Phagen. Nach Mischinfektion mit am17/am128 dagegen erfolgt im Bakterium nach vielfacher Replikation der Phagen Genome genetischer Austausch zwischen den zahlreichen DNA-Strängen, der schließlich zur Produktion von rekombinanten Wildtyp-Phagenpartikeln führt. Das Vorkommen von Rekombination in einer Zelle kann direkt getestet werden, wenn die Zelle vor der Lyse auf einen nicht-permissiven Indikatorstamm ausplattiert wird. Der "plaque"-Titer ist dann direkt proportional der Rekombinationshäufigkeit in der misch-infizierten Population. (Zum Mechanismus der Rekombination bei T4 siehe Tomizawa und Anraku, 1965; Kozinski, 1968; Richardson<sup>et al</sup>, 1968). Der genetische Austausch zwischen DNA-Strängen im Cytoplasma und folglich die Produktion von rekombinanten Wildtyp-Phagen sollte aber stark behindert sein, sobald ein Septum, das impermeabel ist für DNA-Moleküle,

das Zellinnere teilt. Die Häufigkeit von Rekombinationen in einer synchronen Population ist ein Maß für die Fähigkeit der Zellen, den Austausch von DNA-Molekülen innerhalb der Zellen während unterschiedlicher Entwicklungsphasen zu ermöglichen.

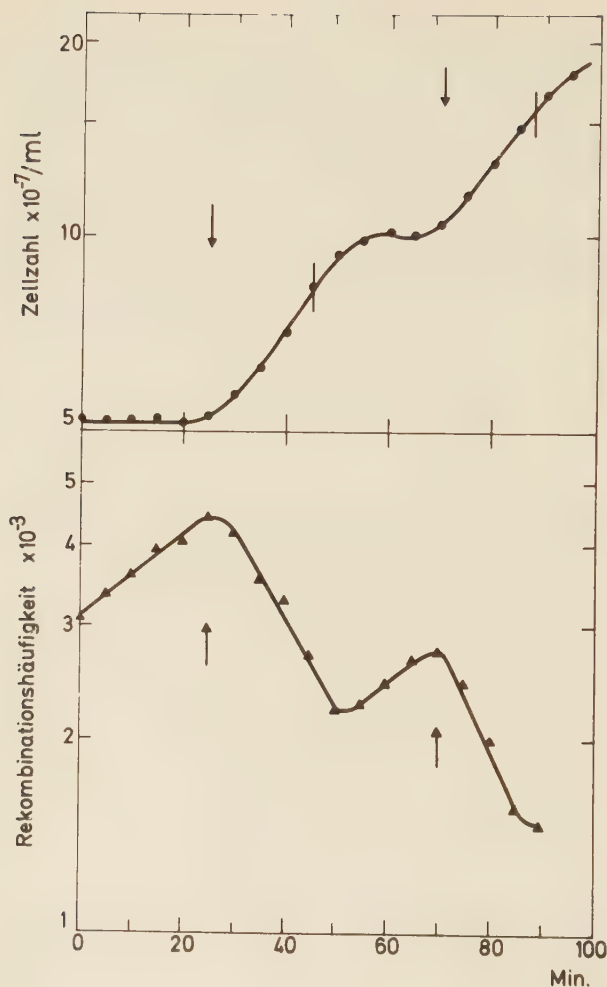
Proben von E. coli B/r/1 werden mit der gleichen Konzentration von am17 und am122 infiziert. Beide Phagentypen zeigen die gleiche Adsorptionsrate. Nach einer Adsorptionszeit von 6 min wird die Reaktion durch Zugabe von anti-T4-Antiserum gestoppt und das Gemisch nach Ausverdünnung des Antiserums auf Indikatorplatten gebracht.

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein oder mehrere Phagen des 1. Typs an ein Bakterium adsorbieren, beträgt bei gegebener Multiplizität  $1 - P(o_1, m_1)$ , ebenso die Wahrscheinlichkeit, daß ein oder mehr Phagen des 2. Typs adsorbieren  $1 - P(o_2, m_2)$ . Solange die Zelle nicht durch ein Septum geteilt ist, ist die Wahrscheinlichkeit, daß Phagen des 1. und des 2. Typs an die gleiche Zelle adsorbieren  $(1 - e^{-m_1})(1 - e^{-m_2})$  und da  $m_1 = m_2$  ist:

$$P_a = (1 - e^{-m})^2 \quad (4)$$

Nach der Septumbildung kann Rekombination nur stattfinden, wenn beide Phagen an dieselbe Hälfte der Zelle adsorbieren. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist:

$$P_b = 2(1 - e^{-\frac{m}{2}})^2 \quad (5)$$



Figur 12. Häufigkeit der Rekombination nach Mischinfektion einer synchronen Zellkultur mit T4 am 17 und T4 am 128. Die Phagen werden in einer Konzentration von je  $1 \times 10^6$  Partikel/ml zugegeben. Nach 6 min Inkubation wird dem Reaktionsgemisch Anti-T4-Antiserum in einer Endverdünnung von 1 : 100 zugefügt. Proben werden auf TY-Platten, mit einem Rasen von E.c.B/r/1 gebracht. Nach INN-Inkubation enthält jede Platte etwa 100 - 400 Phagenlöcher. Kontrollkultur = ●. Rekombinanten = ▲. Die Pfeile markieren jeweils den Beginn der Zellteilung bzw. den Beginn des Rek.-Abfalls (siehe Text).

Der Abfall an Rekombinanten, der zur Zeit der Septumbildung erwartet wird, ergibt sich aus dem Verhältnis von Gleichung (4) und (5):

$$\frac{P_a}{P_b} = \frac{1}{2} \left( 1 + e^{\frac{r}{2}} \right)^2 \quad (6)$$

Er nähert sich dem Faktor 2 bei niedriger Multiplizität für beide Phagentypen.

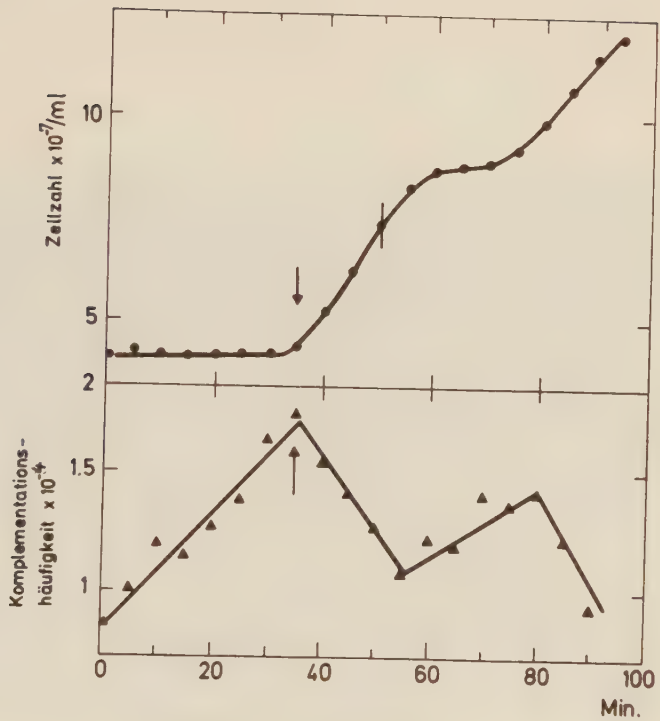
In Fig. 12 wird gezeigt, daß die Häufigkeit der Rekombination eine Funktion des Zellalters ist. Die Proben werden mit einer Phagenkonzentration (am17/am128) infiziert, die 1/50 des Zelltiters ist. Bei einem Zellalter von 0 min findet in  $3 \times 10^{-3}$  Bakterien Rekombinationen statt. Während der nächsten 25 min steigt die Häufigkeit auf  $4.5 \times 10^{-3}$  an, wiederum wegen der Zunahme des Zellvolumens, und fällt dann ab auf  $2.3 \times 10^{-3}$ . Das ist eine Abnahme um den Faktor 2, die nach der Kompartimentalisierung der Zelle für die Rekombinationsfrequenz erwartet wird. Das gleiche wiederholt sich in der zweiten Generation, Da sich jedoch die Multiplizität wegen des erhöhten Zelltiters erniedrigt, wird eine entsprechende niedrigere Zahl an Rekombinationen gemessen.

Wenn es durch Bildung eines Septums zu einer vorzeitigen Kompartimentalisierung der Zelle kommt, sollte die Zahl der Rekombinanten um eine entsprechende Zeit vor dem Beginn der Zellteilung der Kontrolle abnehmen. Die Abnahme der Zahl der Rekombinanten tritt aber erst zu dem Zeitpunkt ein, an dem auch die Zellen anfangen, sich zu teilen (Pfeile in Fig. 12). Der Anstieg des Zelltiters der Kontrollkultur und der Abfall der Rekombinationen sind fast symmetrisch. Daraus folgt, daß ein Septum, das mög-

licherweise in der Teilungsphase gebildet wird, permeabel ist für DNA Moleküle.

#### Komplementation von T4 in E. coli B/r/1

Der Versuch ist konzipiert wie der vorherige, es werden jedoch zwei frühe T4-am-Mutanten benutzt, amN82 (Gen 44) und amN122 (Gen 42). Beide Phagentypen zeigen keine DNA Synthese im nicht-permissiven Bakterienstamm. Da beide Gene eng gekoppelt sind, ist ihre Rekombinationshäufigkeit sehr gering. Die Replikation beider Phagengenome im Bakterium wird erst möglich, wenn die jeweils fehlende Funktion durch das entsprechende Genprodukt komplementiert wird. Vor einem DNA-Austausch im Cytoplasma muß also zunächst eine Vermischung von Proteinen stattfinden. Zellproben werden mit einer sehr geringen Phagenkonzentration von am17/am128 misch-infiziert (1 bis  $0.5 \times 10^{-1}$  für jeden Partner), das Reaktionsgemisch nach 6 min Adsorption mit Antiserum versetzt und Proben auf einen Bakterienrasen ausplattiert, der die Vermehrung von T4 am-Mutanten erlaubt. Aus der Zahl der entstehenden Phagenlöcher ("plaques") ergibt sich direkt die Häufigkeit der Komplementation. Fig. 13 zeigt, daß in der Zeit, in der die synchrone Kultur ihr Volumen nahezu verdoppelt (0 - 30 min), die Häufigkeit der Komplementation von  $1 \times 10^{-4}$  auf  $2 \times 10^{-4}$  steigt. Der Abfall beginnt aber erst wieder, wenn die Kontrollkultur mit der Teilung beginnt (Pfeile in Fig. 13) und erreicht etwa  $1 \times 10^{-4}$  in der Zeit, in der sich der Zelliter der Kontrolle verdoppelt.



Figur 13. Häufigkeit der Komplementation nach Mischinfektion einer synchron wachsenden Kultur mit T4 amN82 und T4 amN122. Beide Phagen werden mit einer Konzentration von je  $5 \times 10^5$  Partikel/ml alle 5 min mit Proben von *E. coli* B/r/1 für 6 min inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von Anti-T4-Antiserum (Endverdünnung  $10^4$ ) gestoppt und ein Teil des Gemisches auf TY-Platten ausgestrichen, die beschichtet sind mit dem am-permissiven Stamm CR63. Die Pfeile markieren den Beginn der Zellteilung bzw. den Beginn des Abfalls an Komplementationen.

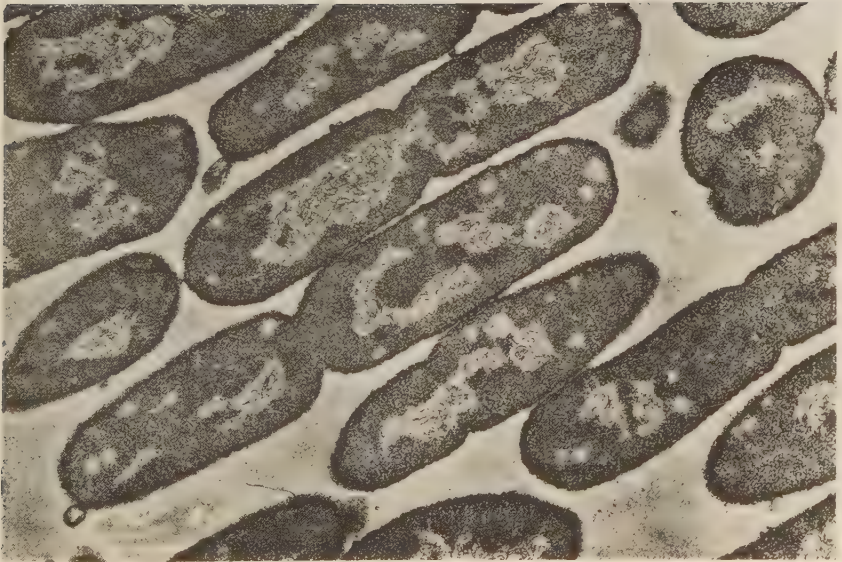
Daraus ergibt sich, daß bis unmittelbar vor der Teilung die Vermischung von Proteinmolekülen in den entstehenden Tochterzellen möglich ist. Ein Membranscutum, das die Zelle vor der Teilung in zwei Reaktionsräume kompartmentalisiert, müßte also permeabel sein sowohl für DNA wie auch für Proteinmoleküle. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist gering. Elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen erkennen, daß zumindest für E. coli B/r unter physiologischen Bedingungen die Teilung nicht über den bisher angenommenen Teilungsschritt verläuft.

#### Teilungsstadien im elektronenmikroskopischen Bild

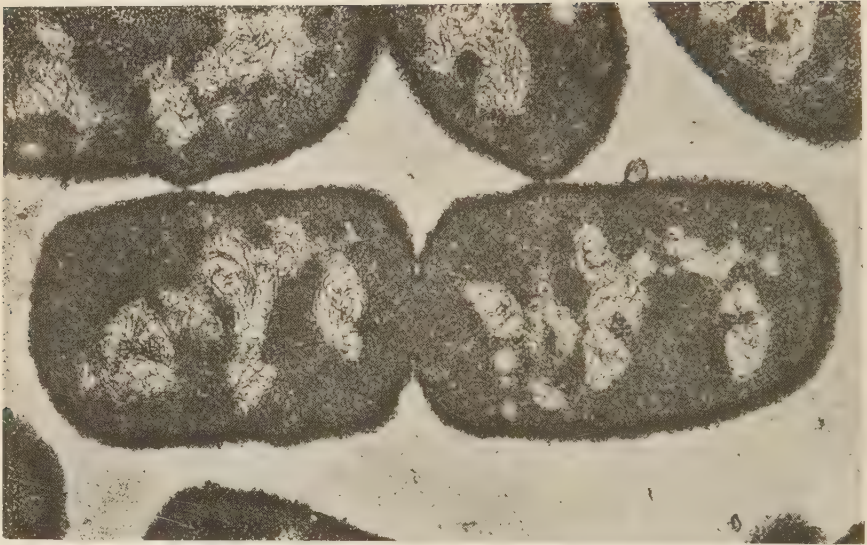
Aus einer teilungssynchronen Kultur von E. coli B/r/1, die mit einer Generationszeit von 43 min wächst, werden bei 35 min und 40 min Proben entnommen und die Zellen geerntet.

Da es für unsere Zwecke wesentlich ist, Zellen zu bekommen, die in Längsrichtung orientiert sind, werden die Bakterien vor der Einschließung in Agar (siehe Material und Methoden) auf eine plane Agaroberfläche zentrifugiert.

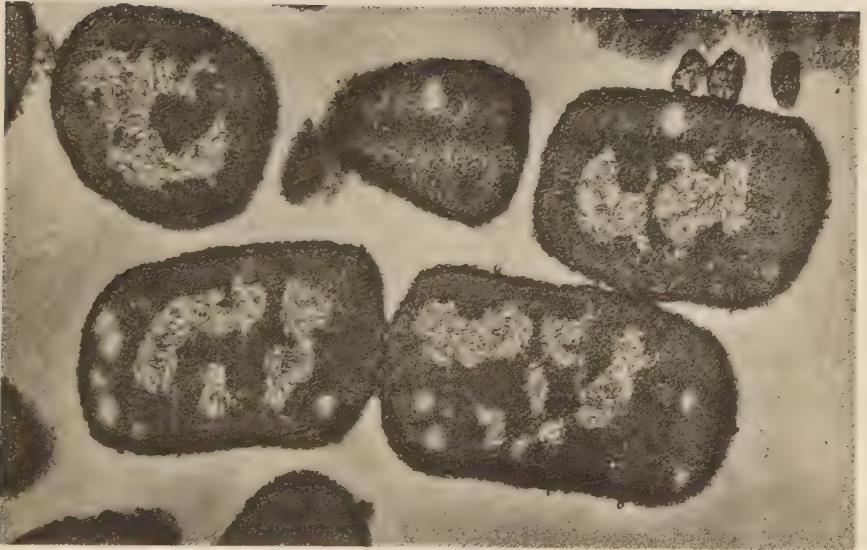
Fig. 14 , 15 und 16 zeigen Dünnschnittaufnahmen von Bakterien während unterschiedlicher Teilungsphasen. Die Teilung vollzieht sich als konzentrische Einstülpung aller Schichten der Zellhülle im Medianbereich. Zwischen den Einschnürungen findet sich keine Struktur, die als Septum angesprochen werden könnte. Die jeweiligen Plasmabereiche der Tochterkeime sind bis kurz vor der Teilung miteinander verbunden.



Figur 14. Dünnschnitt von orientierten Zellen des Bakterienstammes E.c.B/r/1. Die Bakterien wurden aus einer synchronen Kultur bei einer Generationszeit von 35 min geerntet, fixiert, eingebettet und kontrastiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Drei Teilungsstadien sind erkennbar. In zwei Zellen scheint die DNA Segregation abgeschlossen; in einer scheinen die D1A Kopien noch miteinander verbunden. Vergrößerung: 32.000-fach.



Figur 15. Dünnschnitt von F.c.B/r/1 in einem späten Teilungsstadium  
(Zellalter 40 min). Die Teilung vollzieht sich als konzentrische  
Einwanderung aller Schichten der Zellhülle. Ein Septum in der Teil-  
ungsebene ist nicht erkennbar. Die Kerne sind vollständig auf die  
entstehenden Tochterzellen verteilt. Vergrößerung: 75.000-fach.



Figur 16. Dünnschnitt von *E. coli* B/r/l in einem sehr späten Teilungsstadium (Zellalter 40 - 45 min) kurz vor der physischen Trennung der Tochterzellen. Beide Plasmabereiche stehen noch unmittelbar in Kontakt miteinander. Im oberen Bereich des Bildes sieht man zwei Tochterzellen kurz nach der Teilung. Vergrößerung: 69.000-fach.

## DISKUSSION

Nach Einwirkung antibakteriell wirkender Substanzen läßt sich die Teilungsphase von E. coli B/r aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeiten, die abhängig sind vom Zellalter, funktionell in einzelne Schritte auflösen. Als letal wirkende Agenzien wurden benutzt: 1. Penicillin, 2. der Bakteriophage T4 und 3. das Colicin E2. Allen drei Substanzen ist gemeinsam, daß sie von außen mit unterschiedlichen Komponenten der Zellhülle in weitgehend bekannter Weise reagieren. Sie dienen gleichsam als "Sonden" um Veränderungen ihres Substrats während des Teilungsgeschehens sichtbar zu machen. Daraus ergibt sich folgende Sequenz der Teilungsschritte: Replikationsende - Penicillin-Empf. - E2-Toleranz - T4-Barriere - Teilung.

Nach Pulsbehandlung mit 1000 I.E./ml Penicillin während verschiedener Wachstumsphasen von synchronen Kulturen konnte ein Zellalter determiniert werden, bei dem die Zellen extrem empfindlich werden gegen die Einwirkung des Antibiotikums. Diese Empfindlichkeit entwickelt sich kurz nach der Beendigung einer Replikationsrunde in der Teilungsphase. Da die Empfindlichkeit einer Zelle gegen Penicillin ein Maß für die Aktivität der hydrolytischen Enzyme ist (Rogers, 1970), können wir mit seiner Hilfe einen Teilungsschritt erfassen, der durch morphologische Veränderungen an der Zellwand charakterisiert ist.

Es konnte gezeigt werden, daß Penicillin in Abhängigkeit von seiner Konzentration unterschiedliche Formen der Zellwandsynthese beeinträchtigt. Bei Konzentrationen von 10 - 40 I.E./ml wird spezifisch die Synthese blockiert, die in der Zentralregion der Zelle für die Teilung der Tochterzellen, d.h. die Bildung der neuen Polkappen, nötig ist

(Schwarz et al., 1969; Hoffmann et al., 1972). Die Zellverlängerungs-Synthese (Elongation) dagegen wird in steigendem Maße erst ab 100 Einheiten gehemmt.

Dem unterschiedlichen morphologischen Effekt des Penicillins auf die wachsende Zelle entspricht eine unterschiedliche hemmende Wirkung auf zwei verschiedene hydrolysierende Enzyme (Hartmann et al., 1972). Die Penicillinkonzentration, die spezifisch die Teilung hemmt, blockiert mit gleicher Spezifität die Aktivität von Endopeptidasen.

Die Pulsbehandlung mit 1000 Einheiten, wie wir sie in den Versuchen von Fig.2 anwendeten, entspricht weitgehend einer Langzeitbehandlung von 10 - 40 Einheiten (Hoffmann et al., 1972). Die hohe Empfindlichkeit gegen Penicillin, die früh in der Teilungsphase auftritt, kann daher nur eine Aktivierung der Endopeptidasen bedeuten, die spezifisch die Voraussetzung für die Synthese der Polkappen schaffen.

Ein weiterer Schritt in der Teilungsphase wurde sichtbar nach Behandlung von Bakterienzellen während unterschiedlicher Wachstumsphasen mit dem Bakteriophagen T4. Es wurde beobachtet, daß bei einem bestimmten Alter die Zahl der Zellen, die die Phageninfektion überstehen, plötzlich stark ansteigt, obwohl sich die Rate der Adsorption in dieser Zeit nicht ändert (Fig. 4 und 5). Die Höhe dieses Anstiegs richtete sich nach der Multiplizität der Infektion (Tabelle 1). Das zeigt, daß wir es mit einem Übergang von einer 1-Treffer- zu einer 2-Treffer-Kinetik der Inaktivierung zu tun haben. Das heißt, daß sich in der Zelle eine

Barriere bildet, die die Ausbreitung des Tötungssignals verhindert, das von der Adsorption eines Phagen ausgeht. Diese Barriere bildet sich 10 min nach dem Replikationsende und 10 min vor der Teilung. Zu dieser Zeit besteht die Zelle aus zwei Treffbereichen.

Der Wirkmechanismus der T4 Inaktivierung ist allerdings kaum verstanden. Es können jedoch bei diesem Vorgang Genprodukte des Phagen keine entscheidende Rolle spielen, da auch Ghosts mit gleicher Effizienz töten (Duckworth, 1970) und für diesen Prozess keine Proteinsynthese erforderlich ist (Nomura et al., 1962; Duckworth, 1971). Deshalb muß der primäre Wirkmechanismus in der Phagenhülle und der Art ihrer Interaktion mit der Zellwand liegen.

T4 adsorbiert zunächst an spezifische Rezeptoren in der äußeren Lipopolysaccharidmembran der Zellhülle (Tomaki et al., 1971) und kommt dann mit seinem Schwanzteil in Kontakt mit bestimmten Bereichen der cytoplasmatischen Membran, die eng mit der Zellwand verbunden sind (Bayer, 1968; Schnaitmann, 1971). Unmittelbare Effekte der Adsorption sind Veränderungen der Permeabilitätseigenschaften der Zellhülle (Silver et al., 1968; Buller und Dobbs, 1970) und eine Hemmung der Induzierbarkeit von  $\beta$ -Galaktosidase (Kaempfer und Magasanik, 1967), die wahrscheinlich auf einer Veränderung der DNA-abhängigen RNA Polymerase beruht (Seifert et al., 1969). Diese Reaktionen werden am besten erklärt, wenn man annimmt, daß die Phagenhülle spezifische, lethale Veränderungen in der bakteriellen Zellmembran verursacht. Dadurch werden alle makromolekularen Prozesse gehemmt, die in Verbindung mit der Membran ablaufen.

Vom Bakteriophagen lambda ist bekannt, daß die DNA mit der Membran assoziiert wird, sobald die Transkription in dereprimierten Zellen durch das N Gen-Produkt des Phagen stimuliert wird (Hallick et al., 1969; Sakakibara und Tomizawa, 1971; Nishimoto und Matsubara, 1972). Es ist mithin möglich, daß auch die bakterielle Membran die Funktion eines regulatorischen Mechanismus nicht nur bei der Replikation hat, sondern auch bei der Transkription.

In diesem Zusammenhang ist von Changeux und Thiery (1967) ein Modell vorgeschlagen worden, das von einer hochkooperativen Struktur der Zellmembran ausgeht. Die Bindung von extrazellulären Substanzen an einzelne Komponenten der Membran begünstigt eine lokale Konformationsänderung, die sich in einem "spreading effect" über die gesamte Zelloberfläche ausbreitet. Wir gehen deshalb davon aus, daß die Tö- tungsbarriere gegen T4 eine Eigenschaft der Zellhülle ist. Das wird durch weitere Ergebnisse bestätigt werden (siehe unten).

Um Veränderungen der Cytoplasmamembran sichtbar zu machen, ließen wir während verschiedener Wachstumsphasen Colicin E2 auf Bakterien einwirken. Wir fanden eine Zeit im Teilungszyklus, in der die Zellen weniger sensitiv sind gegen das Agens. Diese größere E2-Toleranz ist allerdings nicht abhängig von der Multiplizität der Infektion und verschwindet bereits vor der Teilung wieder. Das zeigt, daß es einen grundsätzlichen Unterschied gibt zwischen der T4-Barriere und der E2-Toleranz.

Colicin E2 bindet an spezifische Rezeptoren der Cytoplasmamembran (Luria, 1964; Nomura, 1964) und initiiert dadurch die Transmission einer periplasmatischen Endonuklease (I), die den Abbau der Wirts-DNA verursacht (Almendinger und Hager, 1972).

Unsere Versuche deuten darauf hin, daß es in der Teilungsphase eine Zeit gibt, in der die Membran kurzfristig so verändert wird, daß die Transmission des E2-Tätigkeitssignals erschwert, und vielleicht dadurch das Eindringen der periplasmatischen Endonuklease I in das Cytoplasma behindert wird.

Mit Hilfe von Penicillin, T4 und Colicin E2 können also in der Teilungsphase von *E. coli* ganz klar einzelne Teilungsschritte unterschieden werden. Aufgrund der Reaktionsorte und der Wirkmechanismen, können wir sagen, welche Komponenten der Zellhülle beteiligt sind und welche ihrer Eigenschaft verändert werden. Nach ihrem zeitlichen Auftreten in der Teilungsphase lassen sich die Teilungsschritte in eine Sequenz einordnen, die ihren Anfang nimmt und getriggert wird vom Replikationsende, und in der physischen Trennung der Tochterzellen endet.

Obwohl über die Natur des Teilungssignals nichts bekannt ist, gehen wir davon aus, daß bei seiner Expression die cytoplasmatische Membran eine wichtige Rolle spielt, deren regulierende und integrierende Funktion im Replicon-Modell hervorgehoben worden ist (Jacob et al., 1963). Es besteht kein Zweifel mehr,

daß das bakterielle Chromosom mit mehreren Haftpunkten an die Membran assoziiert ist (Ganesan und Lederberg, 1965; Ryter und Jacob, 1966; Rosenberg und Cavalieri, 1968; Ryter, 1968; Inouye und Guthrie, 1969; Siccardi et al., 1971). Eine Verbindung wurde nachgewiesen für den Replikationspunkt (Hanawalt und Ray, 1964; Smith und Hanawalt, 1967; Fuchs und Hanawalt, 1970) und für die Anfangs- (origin) und Endmarker (terminus) des Chromosoms (Sueoka und Quinn, 1968; Yamaguchi et al., 1971). Im Einzelnen ist es sehr gut möglich, daß durch das Replikationsende über die Membran die Aktivierung des Enzymsystems erfolgt, das die Bildung der Polkappen katalysiert und selbst membrangebunden ist (Schwarz et al., 1970; Hartmann et al., 1972).

Der durch geringe Penicillinkonzentrationen hemmbare Teilungsschritt wird kurz nach dem Replikationsende gemessen (Fig. 2). Etwa 5 min später folgt die Bildung der T4-Barriere (Fig. 4). Nicht so exakt lokalisierbar, etwa zwischen beiden, werden die Bakterien E2-tolerant. Da die Teilung im Ganzen durch das Replikationsende gesteuert wird, sollte auch jeder einzelne Schritt der Sequenz vom Replikationsende abhängen. Daß diese Abhängigkeit bei allen Teilungsschritten besteht, ist in den Figuren 3, 5 und 8 gezeigt worden. Darüber hinaus würde man aber auch eine Abhängigkeit untereinander erwarten, so daß eine Hemmung des 1. oder 2. Schritts jeweils auch den folgenden 2. oder 3. blockierte. Der Teilungsablauf gliche danach einem metabolischen Prozess, in dem eine

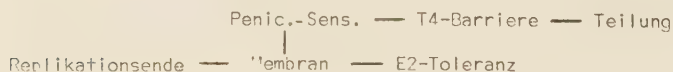
Reaktion die Voraussetzung und das Substrat schafft für die folgende Reaktion.

Diese einfache Beziehung wird zwischen dem penicillin-sensitiven Schritt und der Ausbildung einer T4-Barriere gefunden. Danach scheint diese eine Konsequenz der lokalisierten Zerstörung der durchgehenden Struktur des Mureinsacculus zu sein.

Keine Beziehung besteht dagegen zwischen dem penicillin-sensitiven Schritt und der E2-Toleranz. Diese wird auch gemessen in Zellkulturen, in denen durch 10 Einheiten Penicillin die Teilung spezifisch blockiert ist. (Fig. 11).

Die Teilung kann also keine einfache, lineare Sequenz sein, sondern erfolgt mindestens auf zwei verschiedenen, parallelen "pathways". Eine solche komplexe Sequenz des Teilungsprozesses war bereits von Hirota aufgrund der Beobachtung an Teilungsmutanten gefordert worden (siehe Einleitung). Er schlägt vor, daß der gesamte Prozess wiederum durch die Cytoplasmamembran koordiniert wird, die damit eine dem Spindelapparat bei Eukaryonten analoge Funktion erfüllt.

Aufgrund der bisherigen Informationen können wir die einzelnen Teilungsschritte in folgender Weise korrelieren:



In dem einen Arm dieser Sequenz beobachten wir primär Veränderungen der Zellwand, im anderen Arm Veränderungen der Cytoplasmamembran.

Offensichtlich gibt es im Teilungsablauf zwei morphologische Prozesse, die nebeneinander an der Zellwand und an der Membran ablaufen und normalerweise koordiniert sind. Es ist aber möglich, beide Prozesse zu entkoppeln. Nach spezifischer Hemmung der Teilungsfähigkeit durch geringe Penicillinkonzentrationen wird ein anderer sehr entscheidender Teilungsprozess aber weiterhin ausgeführt, nämlich die Trennung (Segregation) der replizierten Chromosomen (Donachie und Begg, 1970). Die gleiche Entkopplung der Teilungsprozesse findet sich bei einigen Teilungsmutanten (siehe Einleitung).

Es liegt nahe, zwischen dem Teilungsprozess der Segregation und der E2-Toleranz einen direkten Zusammenhang zu sehen.

Im Replicon-Modell (Jacob et al., 1963) wurde als Mechanismus der Segregation die Neusynthese von Membranmaterial zwischen den Haftpunkten der Chromosomen angenommen (Chai und Lark, 1967; Ryter et al., 1968; Trembley et al., 1969), wodurch sie zu den entgegengesetzten Polen bewegt werden. Bisher ist es allerdings nicht möglich gewesen, lokale Membransynthese eindeutig nachzuweisen (Autissier und Kopes, 1971; Tsukagoshi et al., 1971).

Die Neusynthese von Membranmaterial zwischen den DNS-Haftpunkten kann jedoch in zwei Formen erfolgen: 1. als Längswachstum der Membran oder 2. als konzentrisches Wachstum nach innen und Bildung eines Querseptums.

Für die zweite Alternative könnte die Beobachtung sprechen, daß T4 ab einem gewissen Zellaalter (10 min nach dem Replikationsende in Fig. 4) nur noch eine Zellhälfte töten kann, während die andere überlebt. Diese Interpretation der T4 Inaktivierung wurde von Clark (1968) favorisiert und als physiologische Teilung bezeichnet. Sie wurde definiert als Kompartimentalisierung der Zelle, wodurch cytoplasmatische Ereignisse in einer Hälfte der Zelle unabhängig werden von cytoplasmatischen Ereignissen im anderen Teil der Zelle.

Es wurden zwei Ereignisse während des Teilungszyklus von E. coli gemessen, die sich im Cytoplasma abspielen, nämlich die Rekombination und die Komplementation zwischen genetisch verschiedenen Phagengenomen. Für die Rekombination müssen zwei Genome in Kontakt kommen, für die Komplementation ist eine unbehinderte Diffusion von Proteinen nötig. Falls im Teilungszyklus ein Septum, das impermeabel für DNA und Proteinmoleküle ist, vor der physischen Trennung gebildet wird, sollte es die Möglichkeit des genetischen Austausches innerhalb der Zelle drastisch reduzieren. Nach Mischinfektion einer synchronen Bakterienkultur sollte daher der Abfall an Rekombinanten bzw. Komplementationsereignissen zu einer Zeit beginnen, die früher liegt als der

Beginn der Zellteilung. Das aber ist nicht der Fall, vielmehr fällt beides zeitlich genau zusammen, wie in den Figuren 12 und 13 gezeigt wurde. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Chromosomen-segregation durch Wachstum der Zellmembran nach innen erfolgt, und dadurch die Zelle schließlich bereits vor der physischen Teilung physiologisch geteilt wird.

Das aber bedeutet weiter, daß die Barriere, die 10 min nach dem Replikationsende gegen das Tötungssignal von T4 ausgebildet wird, nicht im Cytoplasma lokalisiert sein kann, sondern eine Eigenschaft der Zellhülle ist. Es erscheint möglich, daß diese Barriere den oben erwähnten "spreading effect" bei der Konformationsänderung der Membran begrenzt.

Der Austausch von DNA und Proteinmolekülen ist noch zu einem sehr späten Zeitpunkt in der Teilungsphase möglich. Das wird bestätigt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterien in verschiedenen Phasen der Teilung. Auf allen Bildern ist deutlich zu erkennen, daß die Plasmabereiche der entstehenden Tochterzellen nicht vorzeitig durch ein Septum getrennt werden, sondern bis kurz vor der Trennung durch eine Plasmabrücke verbunden sind. Demnach teilt sich E. coli B/r unter physiologischen Bedingungen durch eine allmähliche Einschnürung. Ein Septum wächst konzentrisch von außen nach innen. Die Verbindung zwischen den entstehenden Tochterzellen wird erst unmittelbar vor Teilung unterbrochen:

LITERATUR

- Adler, H. J., W. D. Fisher, A. Cohen, and A. A. Hardigree. 1967. Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 57 : 321.
- Almendinger, R., and L. P. Hager. 1972. Role for endonuclease I in the transmission process of Colicin E<sub>2</sub>. *Nature New Biology* 235 : 199.
- Autissier, F., and A. Kepes. 1971. Segregation of membrane markers during cell division in *E. coli*. II. Segregation of lac-permease and mel-permease studied with a penicillin technique. *Biochim. Biophys. Acta* 249 : 611.
- Bayer, M. E. 1968. Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of *E. coli*. *J. Virology* 2 : 346.
- Bhattacharyya, P., L. Wendt, E. Whitney, and S. Silver. 1970. Colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*: resistance of membranes to colicin E1. *Science* 168 : 998.
- Bird, R., and K. G. Lark. 1968. Initiation and termination of DNA replication after amino acid starvation of *E. coli* 15T<sup>-</sup>. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33 : 799.
- Braun, V., and U. Schwarz. 1969. Structure, function, and biosynthesis of the rigid layer of the *Escherichia coli* cell wall. *J. Gen. Microbiol.* 57 : iii.
- Brown, W. C., and F. E. Young. 1970. Dynamic interaction between cell wall polymers, extracellular protease and autolytic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 38 : 564.

- Buller, C. S., and K. Dobbs. 1970. T4-coliphage infection of *E. coli* with defective cell envelope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 658.
- Caro, L., and C. M. Berg. 1969. Chromosome replication in *Escherichia coli*. II. Origin of replication in  $F^-$  and  $F^+$  strains. *J. Mol. Biol.* 45 : 325.
- Chal, N. C., and K. G. Lark. 1967. Segregation of deoxyribonucleic acid in bacteria: Association of the segregating unit with the cell envelope. *J. Bacteriol.* 94 : 415.
- Changeux, J. P., and J. Thiéry. 1967. On the mode of action of colicins: A model of regulation at the membrane level. *J. Theoret. Biol.* 17 : 315.
- Chapman, G. B. 1959. Electron microscope observations on the behaviour of the bacterial cytoplasmic membrane during cellular division. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6 : 221.
- Clark, D. J., and B. Maaløe. 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 23 : 99.
- Clark, D. J. 1968. The regulation of DNA replication and cell division in *E. coli* B/r. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33 : 823.
- Cole, R. M., and J. J. Hahn. 1962. Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science* 135 : 722.
- Cole, R. M. 1965. Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts. III. Bacterial cell-wall replication followed by immunofluorescence. *Bacteriol. Rev.* 29 : 326.
- Cooper, S., and C. E. Helmstetter. 1968. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 31 : 519.
- DePamphilis, M. L. 1971. Isolation of bacteriophages T2 and T4 attached to the outer membrane of *E. coli*. *J. Virology* 7 : 683.

- Donachie, W. D., and K. G. Beng. 1970. Growth of the bacterial cell.  
Nature 227 : 1220.
- Duckworth, D. H. 1970. Biological activity of bacteriophage ghosts and  
"take-over" of host functions by bacteriophage. Bacteriol. Rev. 34 : 344.
- Duckworth, D. H. 1971. Inhibition of host deoxyribonucleic acid synthesis  
by T4 bacteriophage in the absence of protein synthesis.  
J. Virology 9 : 754.
- Eberle, H., and W. Masher. 1971. Effect of nalidixic acid on semi-  
conservative replication and repair synthesis after UV irradiation  
in *E. coli*. J. Bact. 105 : 908.
- Fabricant, R., and D. Kennell. 1970. Inhibition of host protein synthesis  
during infection of *E. coli* by bacteriophage T4. J. Virology 6 : 772.
- Frédéricq, P. 1958. Colicins and colicinogenic factors. Symp. Soc.  
Exptl. Biol. 12 : 104.
- Fuchs, E., and P. Hanawalt. 1970. Isolation and characterization of the  
DNA replication complex from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 52 : 301.
- Ganesan, A. T., and J. Lederberg. 1965. A cell-membrane bound fraction  
of bacterial DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18 : 924.
- Ghuysen, J. M., J. L. Strominger, and D. J. Tipper. 1968. Bacterial  
cell walls. Compr. Biochem. 26A : 53.
- Ghuysen, J. M. 1969. Use of bacteriolytic enzymes in determination of  
wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev. 32 : 425.
- Goss, W. H., W. A. Deitz, and T. M. Cook. 1965. Mechanism of action of  
nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic  
acid synthesis. J. Bacteriol. 89 : 1068.

- Gross, J. D. 1971. DNA replication in bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology 57 : 39.
- Hallick, L., R. P. Boyce., and H. Echols. 1969. Membrane association by bacteriophage  $\lambda$  DNA: Possible direct role of regulator gene N. Nature 223 : 1239.
- Hanawalt, P. C., and D. S. Ray. 1964. Isolation of the growing point in the bacterial chromosome. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52 : 125.
- Hartmann, R., J.-V. Hölftje, and U. Schwarz. 1972. Targets of penicillin action in *Escherichia coli*. Nature 235 : 426.
- Helmstetter, C. E., and D. J. Cummings. 1964. An improved method for the selection of bacterial cells at division. Biochem. Biophys. Acta 82 : 608.
- Helmstetter, E. C. 1967. Rate of DNA synthesis during the division cycle of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 24 : 417.
- Helmstetter, C. E., and S. Cooper. 1968. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli* B/r. J. Mol. Biol. 31 : 507.
- Helmstetter, C. E., and O. Pierucci. 1968. Cell division during inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 95 : 1627.
- Helmstetter, C. E., S. Cooper, O. Pierucci, and E. Revelas. 1968. On the bacterial life sequence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 809.
- Helmstetter, C. E. 1969. Regulation of chromosome replication and cell division in *Escherichia coli*. p. 15 - 35 In G. M. Padilla, G. L. Whitson, and I. L. Cameron (ed.) The cell cycle: gene-enzyme interactions. Academic Press Inc., New York.

- Iwota, Y., A. Ryter, and F. Jacob. 1968. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 677.
- Hoffmann, B., W. Messer, and U. Schwarz. 1972. Regulation of polar cap formation in the life cycle of *Escherichia coli*. J. Supramolecular Structure. (im Druck).
- Inoué, M. 1969. Unlinking of cell division from DNA-replication in a temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 99 : 842.
- Inoué, M., and J.P. Guthrie. 1969. A mutation which changes a membrane protein of *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64 : 957.
- Inoué, M., and A.B. Pardee. 1970. Changes of membrane proteins and their relation to deoxyribonucleic acid synthesis and cell division of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 245 : 5813.
- Jacob, F., L. Siminovitch, and E.L. Wollman. 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. Ann. Inst. Pasteur 83 : 295.
- Jacob, F., S. Brenner, and F. Cuzin. 1963. On the Regulation of DNA Replication in Bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 : 329.
- Kaemfer, R.O.R., and B. Magasanik. 1967. Effect of Infection with T-even Phage on the Inducible Synthesis of  $\beta$ -Galactosidase in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 27 : 453.
- Kellenberger, E., and A. Ryter. 1964. Modern developments in electron microscopy. In bacteriology, p. 335. In B.M. Siegel (ed.), Academic Press, Inc., New York.

- Kohiyama, M., D. Cousin, A. Rytter, and F. Jacob. 1966.  
Mutants thermosensibles d'E. coli K12. Isolement et  
caractérisation rapide. Ann. Inst. Pasteur 110 : 456.
- Kozinski, A.W. 1969. Molecular recombination in the ligase negative  
T4 amber mutant. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 375.
- Lederberg, J. 1956. Bacterial Protoplasts induced by Penicillin.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 42 : 574.
- Leutsch, M., and U. Schwarz. 1967. Abbau des Mureins als erster  
Schritt beim Wachstum des Sacculus. Z. Naturforschg. 22b : 545.
- Luria, S.E. 1964. On the mechanism of action of colicins.  
Ann. Inst. Pasteur 107 : 315.
- Maaløe, O. 1961. The control of normal DNA replication in bacteria.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26 : 45.
- Maaløe, O., and M.O. Kjelgaard. 1966. Control of macromolecular  
synthesis. W.A. Benjamin, Inc., New York.
- Maeda, A., and M. Nomura. 1966. Interaction of Colicins with  
Bacterial Cells. I Studies with Radioactive Colicins.  
J. Bacteriol. 91 : 685.
- Nishimoto, T., and K. Matsubara. 1972. The correlation between  
transcription and membrane-association of  $\phi$  DNA.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46 : 342.
- Nomura, M., K. Matsubara, K. Okamoto, and R. Fujimura. 1962.  
Inhibition of host nucleic acid and protein synthesis by bacterio-  
phage T4: its relation to the physical and functional integrity  
of host chromosome. J. Mol. Biol. 5 : 535.

Nomura, M. 1963. Mode of Action of Colicines.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 : 315.

Nomura, M. 1964. Colicines and related bacteriocins.

Ann. Rev. Microbiol. 21 : 257.

Pierucci, O. 1969. Regulation of cell division in *Escherichia coli*.

Biophys. J. 9 : 90.

Pierucci, O., and C.E. Helmstetter. 1969.

Chromosome replication, protein synthesis and cell division

in *Escherichia coli*. Fed. Proc. 28 : 1755.

Pierucci, O. 1972. Chromosome replication and cell division in

*Escherichia coli* at various temperatures of growth.

J. Bacteriol. 109 : 848.

Powell, E.O. 1956. Growth rate and generation time of bacteria,

with special reference to continuous culture.

J. Gen. Microbiol. 15 : 402.

Reeve, J. N., D. J. Groves, and D.J. Clark. 1970.

Regulation of Cell Division in *E. coli*: Characterization of

Temperature-Sensitive Division Mutants. J. Bacteriol. 104 : 1052.

Reynolds, B.L., and P.R. Reeves. 1963. Some observations on the mode

of action of colicine F. Biochem. Biophys. Res. Commun. 11 : 140.

Richardson, CC., Y. Masamune, T.R. Live, A. Jacquemin-Sablon, B. Weiss,

and G. C. Fareed. 1968. Studies on the joining of DNA by polynucleotide  
ligase of phage T4. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 151.

Rogers, H.J., and J. Mandelstam. 1962. Inhibition of cell-wall mucopeptide

formation in *Escherichia coli* by benzylpenicillin and 6- $\alpha$ -D(-)- $\alpha$ -amino-  
phenylacetamido/ penicillanic acid (ampicillin). Biochem. J. 84 : 299.

- Rogers, H. J. 1970. Bacterial Growth and Cell Envelope. Bacteriol. Rev. 34 : 194.
- Rosenberg, B. H., and L. F. Cavalieri. 1968. Shear sensitivity of the *E. coli* genome: multiple membrane attachment points of the *E. coli* DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 65.
- Ryter, A., and F. Jacob. 1966. Etude morphologique de la liaison du noyau à la membrane chez *E. coli* et chez les protoplastes de *B. subtilis*. Ann. Inst. Pasteur 110 : 801.
- Ryter, A. 1968. Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study. Bacteriol. Rev. 32 : 39.
- Ryter, A., Y. Hirota, and F. Jacob. 1968. DNA-membrane complex and nuclear segregation in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 669.
- Y. Sakakibara, and J. I. Tomizawa. 1971. Gene II and Membrane association of lambda DNA. in A. D. Hershey (ed.), The Bacteriophage lambda. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Schnaitman, C. A. 1971. Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *E. coli* by Triton X-100. J. Bacteriol. 108 : 545.
- Schwarz, U., A. Asmus, and H. Frank. 1969. Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41 : 419.
- Schwarz, U., and W. Leutgeb. 1971. Morphogenetic Aspects of Murein Structure and Biosynthesis. J. Bacteriol. 106 : 588.
- Selfert, W., P. Qasba, G. Walter, P. Palm, M. Schachner, and W. Zillig. 1969. Kinetics of the alteration and modification of DNA-dependent RNA-polymerase in T4-infected *E. coli* cells. Europ. J. Biochem. 9 : 319.

- Shapiro, C. M., A. G. Siccardi, Y. Hirota, E. Jacob. 1970.  
On the process of cellular division in *Escherichia coli*.  
II. Membrane protein alterations associated with mutations  
affecting the initiation of DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* 52 : 75.
- Shockman, G. D., H. M. Pooley, and J. S. Thompson. 1967.  
Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*.  
III. Localization of the autolysin at the sites of  
cell wall synthesis. *J. Bacteriol.* 94 : 1525.
- Siccardi, A. G., C. M. Shapiro, Y. Hirota, E. Jacob. 1971.  
On the Process of Cellular Division in *E. coli*.  
IV. Altered Protein Composition and Turnover of the Membranes  
of TS-Mutants Defective in Chromosomal Replication.  
*J. Mol. Biol.* 56 : 475.
- Silver, S., E. Levine., P. M. Shielman. 1968.  
Cation Fluxes and Permeability Changes Accompanying Bacteriophage  
Infection of *E. coli*. *J. Virol.* 2 : 763.
- Smith, D. W., and P. C. Hanawalt. 1967.  
Properties of the growing point region in the bacterial chromosome.  
*Biochem. Biophys. Acta* 147 : 519.
- Steed, P., and R. C. E. Murray. 1966. The cell wall and cell division  
of gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* 12 : 263.
- Strominger, J. L., K. Izaki, M. Matsubashi, and D. J. Tipper. 1967.  
Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase:  
penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Fed. Proc.* 26 : 9.
- Sucoka, W., and W. C. Quinn. 1966. Membrane attachment of the  
chromosome replication origin in *Bacillus subtilis*.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33 : 629.

- Taylor, A. L. 1970. Linkage map. of *E. coli*.  
Bacteriol. Rev. 34 : 155.
- Tomaki, S., T. Sato, M. Matsubashi. 1971. Role of Lipopolysaccharides  
in Antibiotic Resistance and Bacteriophage Adsorption of *E. coli* K-12.  
J. Bact. 105 : 968.
- Tomizawa, J., and N. Anraku. 1965. Molecular mechanism of genetic  
recombination in bacteriophage. III. Joining of parental poly-  
nucleitides of phage T4 in the presence of 5-fluorodeoxyuridine.  
J. Mol. Biol. 11 : 501.
- Trembley, G. Y., M. J. Daniels, and M. Schaechter. 1969.  
Isolation of a cell membrane-DNA-nascent RNA complex from bacteria.  
J. Mol. Biol. 40 : 65.
- Tsukagoshi, N., P. Fielding, C. E. Fox. 1971.  
Membrane Assembly in *E. coli* I: Segregation of Preformed and  
Newly Formed Membrane into Daughter Cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 : 497.
- Ward, C. B., and D. A. Glaser. 1972. Inhibition of initiation of  
DNA synthesis by low concentrations of penicillin. *In Druck*.
- Warner, H.R., and M.D. Hobbs. 1967. Incorporation of uracil - 14C  
into nucleic acids in *Escherichia coli* infected with bacterio-  
phage T4 and T4 amber mutants. Virology 33 : 376.
- Weidel, W., and H. Pelzer. 1964. Bagshaned macromolecules - a new  
outlook in bacterial cell walls. Advan. Enzymol. 26 : 193.  
Interscience Publishers Inc., New York.
- Yamaguchi, K., Murakami, S., H. Yoshikaga. 1971.  
Chromosome-membrane association in *Bacillus subtilis*.  
I. DNA release from membran fraction. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 44 : 1559.



## DANKSAGUNG

Die Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik gemacht. Herrn Prof.Dr.T.Trautner und Herrn Dr.W.Messer danke ich für die hilfreichen Anleitungen und Anregungen bei der Durchführung der Arbeit. Mein Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr.S.Grund für seine wertvolle Unterstützung bei der Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der Abt. Trautner für Ihr Interesse und die anregenden Diskussionen.



## LEBENS LAUF

Ich wurde am 1. Juli 1940 als Sohn des Arztes Hans Onken und seiner Frau Monika, geb. von Trott zu Solz, in Dresden geboren. Nach unserem Umzug nach Delmenhorst in Niedersachsen wurde ich Ostern 1947 in die dortige katholische Grundschule eingeschult. Eine schwere Erkrankung erzwang eine längere Schulunterbrechung. Von 1952 - 1958 besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Delmenhorst, danach bis zum Abitur im Frühjahr 1961 das neusprachliche Gymnasium in Brake an der Unterweser.

Nach dem Abitur erhielt ich im Jesuitenorden - zunächst in Berlin, danach in Pullach bei München - eine mehrjährige Ausbildung in neuscholastischer Philosophie und in Psychologie. Diese Studien schloß ich 1965 mit einem kirchlichen Baccalaureat ab.

Für das Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Münchener Universität für die naturwissenschaftliche Fakultät und hörte Vorlesungen bei den Professoren Aytrum, Lorenz und v. Frisch. In dieser Zeit wurde ich als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

Ab Wintersemester 1966 studierte ich an der Freien Universität Berlin Biologie mit dem Hauptfach Zoologie. Im Wintersemester 1968 legte ich die Vordiplomprüfung ab. Nach einem mehrmonatigen Studienaufenthalt in Indien begann ich meine Dissertationsarbeit im Frühjahr 1970 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik.





